Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Zur infraspezifischen Variabilität: Flavonoide in Helichrysum bracteatum (Vent.) Willd.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Hans-Jürgen Frenzel
aus
Dresden

1963

Aus dem Institut
für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. Rudolf Hänsel

Zur infraspezifischen Variabilität: Flavonoide in Helichrysum bracteatum (Vent.) Willd.

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

vorgelegt von
Hans-Jürgen Frenzel
aus
Dresden

Referent: Professor Dr. R. Hänsel
Korreferent: Professor Dr. Th. Eckardt

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Nov. 1963
Tag der Promotion: 18. Dez. 1963

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin unter Leitung von Herrn Prof. Dr. R. HÄNSEL durchgeführt.

Es sei mir gestattet, an dieser Stelle meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. R. HÄNSEL, für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes sowie für die stete Förderung meiner Arbeit zu danken.

Ferner danke ich der Kustodin am Institut für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin, Frau Dr. L. Langhammer, für wertvolle Anregungen und Hinweise.

Durch ein Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft und durch meine Tätigkeit als wissenschaftlicher Hilfsassistent war es mir finanziell möglich, die vorliegende Arbeit durchzuführen. Auch hierfür spreche ich meinen besten Dank aus.

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung und Problemstellung..... 3

II. Allgemeines über Helichrysum bracteatum..... 6

III. Eigene Untersuchungen..... 1o

A. Methodische Grundlagen..... 12

1. Mikroanalytische Methoden zum Nachweis, der Auftrennung und Identifizierung der Inhaltsstoffe..... 12

a. Tüpfelreaktionen..... 13

b. Papierchromatographische Methoden..... 13

c. Dünnschichtchromatographische Methoden.... 18

2. Methoden zur präparativen Isolierung der Inhaltsstoffe für deren Identifizierung nach den in der Chemie üblichen Methoden..... 22

a. Säulenchromatographische Trennung phenolischer Stoffe an Polyamiden..... 22

B. Die Verteilung der Inhaltsstoffe auf die verschiedenen Pflanzenteile der unterschiedlichen Farbsorten von Helichrysum bracteatum.. 24

1. Vorproben..... 24

2. Papier- und dünnschichtchromatographischer Vergleich der Gesamtextrakte..... 25

C. Identifizierung bzw. Charakterisierung der Inhaltsstoffe..... 28

1. Anthocyane..... 28

a. Vergleich des Hydrolyseprodukts von Fleck 1o mit Cyanidin..... 28

2. Flavone und Flavonole..... 29

a. Vergleich der Aglyka (Fleck 6 und 7) mit Luteolin und Quercetin..... 29

b. Identifizierung von Fleck 4 und 5 als Luteolin-7-glucosid und ein Apigeninglykosid..... 29

c. Identifizierung von Fleck 1 als ein Glykosid des Homo-Orientin sowie Fleck 2 und 3 als Homo-Orientin und Orientin..... 31

Seite

3.Anthochlorpigmente..... 36
a.Vergleich des Anthochlor C mit natürlichem Bractein..... 36
b.Identifizierung von Anthochlor B als ein Chalkonglykosid..... 36
α.Hydrolyse..... 37
β.Alkaliabbau..... 38
γ.UV-Absorptionsmessungen..... 39
δ.Tüpfelreaktionen..... 41
c.Identifizierung von Anthochlor A als ein Chalkonglykosid und Nachweis eines weiteren Aurons..... 43
4.Flavanone..... 45
a.Papierchromatographischer Vergleich der Flavanone mit den cyclisierten Aglyka der Chalkonglykoside A und B..... 45
5.Phenylpropankörper..... 45
a.Vergleich von Fleck 12 mit Chlorogensäure.. 45
D.Experimenteller Teil..... 46
1.Herkunft des Pflanzenmaterials..... 46
2.Aufarbeitungs- und Extraktionsverfahren..... 46
3.Tüpfelreaktionen..... 46
4.Papierchromatographische Technik..... 47
5.Dünnschichtchromatographische Technik..... 47
6.Sprühreagenzien..... 48
7.Elution aus dem Papierchromatogramm..... 49
8.Elution aus dem Dünnschichtchromatogramm..... 49
9.Alkalispaltung..... 49
1o.Säurehydrolyse..... 5o
11.Säulenchromatographie an Perlonpulver..... 51
12.UV-Absorptionsmessungen..... 52
E.Diskussion der Ergebnisse..... 54
Zusammenfassung..... 66
Literaturverzeichnis..... 67
Lebenslauf..... 71

I. Einleitung und Problemstellung

Bereits LINNÉ vertrat die Auffassung, daß formverwandte Pflanzen sich in der Regel auch in ihren Inhaltsstoffen ähnlich seien. Daß dieser Auffassung bisher zu wenig Beachtung geschenkt wurde, ist nach HEGNAUER (42) in erster Linie auf die Lückenhaftigkeit der Kenntnisse von den chemischen Eigenschaften der Pflanzen zurückzuführen. Phytochemische Untersuchungen wurden bisher weitgehend durch ökonomische, medizinische und toxikologische Gesichtspunkte bestimmt. So fehlen in vielen Fällen gerade dort, wo der Systematiker auch andere als rein morphologische Gesichtspunkte beim Ausbau seines Systems zu Rate ziehen möchte, chemische Untersuchungen gänzlich. Daher spielt bei der Abgrenzung der systematischen Gruppen nach wie vor der verhältnismäßig leicht feststellbare äußere morphologische Bau neben anatomischen Kennzeichen die größte Rolle. Zwar hat man sich bemüht, wenn auch ohne viel Erfolg, die Verschiedenheiten der pflanzlichen Eiweiße mit Hilfe der Reaktionen eiweißhaltiger Pflanzenauszüge bei serodiagnostischen Untersuchungen zu erfassen und der Systematik dienstbar zu machen; denn da an die Eiweißstruktur des Protoplasmas alle Lebensvorgänge in besonderem Maße gebunden sind, können wir annehmen, daß uns der Aufbau der Eiweiße am ehesten etwas über die Verwandtschaftsverhältnisse aussagt.

Aus methodischen Gründen beschränken sich die bisher durchgeführten chemotaxonomischen Untersuchungen -von den genannten Ausnahmen abgesehen- jedoch auf die sekundären, niedermolekularen Naturstoffe. So liegen zahlreiche Arbeiten auf dem Gebiet der Alkaloide vor. Der Fortschritt der chromatographischen Methoden in den letzten 15 Jahren ermöglichte es, auch andere niedermolekulare Stoffe in die Betrachtungen einzubeziehen. Besonderes Interesse erlangten in diesem Zusammenhang die im Pflanzenreich so weit verbreiteten Flavonoide. Die Ansichten über den taxonomischen

Wert dieser Stoffgruppe gehen z.Zt. aber noch weit auseinander.Während beispielsweise EGGER (14) den Flavonoiden in dieser Hinsicht eine relativ große Bedeutung beimißt, besteht nach HÄNSEL (33) zwischen der Flavonführung einer Pflanze und deren systematischer Stellung kein gesetzmäßiger Zusammenhang.
Es bleibt also noch die Frage zu klären,ob irgendwelche Molekülstrukturen der C-15-Körper überhaupt ein im Sinne der Taxonomie "wesentliches" Merkmal darstellen.Darunter wären Merkmale zu verstehen,die innerhalb größerer taxonomischer Einheiten unverändert auftreten.Merkmale,die dagegen bereits innerhalb enger Verwandtschaftskreise,innerhalb einer Gattung oder sogar einer Art,zu Variabilität neigen,müssen als"unwesentlich" und für die Systematik als bedeutungslos angesehen werden.
Geeignete Untersuchungsobjekte,um diese Fragen zu bearbeiten, stellen unseres Erachtens Kultursorten von Zierpflanzen dar,die schon innerhalb der gleichen Art in der Färbung ihrer Blüten oder Blütenstände variieren.Diese Variabilität in der Färbung wird bekanntlich durch flavonoide Inhaltsstoffe bedingt.Es wäre jedoch voreilig,bereits auf Grund dieser Tatsache den flavonoiden Merkmalen einen taxonomischen Wert absprechen zu wollen;denn die bisher vorwiegend unter genetischen,chemogenetischen oder biogenetischen Gesichtspunkten (22-25,28,39,4o,47,48,53,65,75) durchgeführten Untersuchungen beschränken sich auf die Inhaltsstoffe aus den buntgefärbten Teilen der floralen Region.
Die Variabilität in der Flavonoidführung könnte sich nun ebenfalls auf diese Region beschränken,während in den anderen Organen,wie den Laubblättern,aber auch den Wurzeln, die nach MOTHES Synthesestätten besonderer Art sind,taxonspezifische Tendenzen zutage treten.BATE-SMITH (3) u.a. Autoren sehen besonders die Inhaltsstoffe der Laubblätter zur Beantwortung von Fragen der Taxonomie als wesentlich geeigneter an als die Bestandteile der buntgefärbten Teile der floralen Region.Nach HÄNSEL (33) treten die taxon-

spezifischen Tendenzen des Sekundärstoffwechsels sogar erst dann hervor,wenn nicht auf ein phytochemisches Merkmal allein,sondern auf die Verteilung des Gesamtflavons innerhalb der Pflanze geachtet wird.Bei Untersuchungen über die infraspezifische Variabilität bestimmter Strukturmerkmale der Flavonoide sollten also möglichst alle Organe der betreffenden Pflanzen berücksichtigt werden.

Untersuchungsobjekt der vorliegenden Arbeit waren sechs Farbsorten von Helichrysum bracteatum (Vent.)Willd.
Nach dem bereits Gesagten war es das Ziel der Arbeit festzustellen:

1. Welches sind die stofflichen Ursachen der bereits äußerlich sichtbaren Variabilität in der Farbausgestaltung der Hüllblätter?
2. Bleibt die Variabilität auf die Inhaltsstoffe der floralen Region beschränkt,oder bestehen Unterschiede in der Flavonoidführung auch in den vegetativen Organen?
3. Die Ergebnisse sollen Hinweise geben auf die taxonomische Wertigkeit flavonoider Merkmale (Oxydationsgrad der Ringe A und B,Ausgestaltung der zentralen C-3-Einheit).

II. Allgemeines über Helichrysum bracteatum

Helichrysum bracteatum (Vent.)Willd.,die als Zierpflanze sehr beliebte Gartenstrohblume,früher als Xeranthemum bracteatum bezeichnet (83),ist ein durch seine Färbung besonders auffallender Vertreter der Kompositen.Als ein Korbblütler mit röhrigen Scheibenblüten gehört sie zur Unterfamilie der Tubuliflorae,innerhalb der sie der Tribus der Inuleae zugeordnet wird.In dieser Tribus sind xerophile,wollig behaarte Pflanzen zusammengefaßt mit meist gelbgefärbten Blüten und am Grunde geschwänzten Antheren sowie Griffeln,die oberhalb der Teilungsstelle keine Fegehaare besitzen.

Die mit über 5oo Arten in Europa,Asien,Afrika und Australien verbreitete Gattung (in der Neuen Welt fehlt diese Gattung gänzlich) umfaßt Pflanzen mit Blütenköpfen,die von zahlreichen trockenhäutigen,vielreihig und dachziegelartig angeordneten Hüllschuppen umgeben werden.Die inneren sind meist ungefärbt und mit einer gelenkartig abgebogenen und strahlig ausgebreiteten Spitze versehen.Die Involukren können -wie bei Helichrysum bracteatum- breit halbkugelig oder auch klein-eiförmig bis zylindrisch wie bei der arzneilich verwendeten Helichrysum arenarium sein.Es handelt sich also um eine schon äußerlich sehr heteromorphe Gattung,die früher von mehreren Autoren wiederholt mit der Gattung Gnaphalium vereint wurde.Auch in der heute adoptierten Fassung kann die Gattung Helichrysum von anderen ihr nahestehenden Gattungen,wie Raoulia,Helipterum, Leptorhynchos,Stenocline,Cassinia u.a. nur schwer auf Grund eindeutig definierter Merkmale abgegrenzt werden und ist mit diesen in verschiedenen Richtungen durch Übergänge verbunden. Als die wesentlichsten Gattungsmerkmale gelten heute besonders der Bau des Pappus,der aus zahlreichen,meist in vier Reihen angeordneten,behaarten oder gefiederten Borsten besteht,und das fast völlige Fehlen von Spreublättern,nur selten finden wir einige im Zentrum zwischen sterilen Blüten.

Die Gattung wird bei BENTHAM (7,8) in mehrere relativ natürliche Sektionen,die jedoch durch Übergänge miteinander verbunden sind,unterteilt.Die Sektion Xerochlaena (DC.)Benth.

zu der Helichrysum bracteatum zählt,umfaßt perennierende,seltener anuelle Pflanzen,die an der Basis meist verholzt sind. Besonders typisch für die Sektion sind die breit-halbkugeligen Involukren.Die Achaenen sind glatt,warzig oder selten ein wenig behaart.Die Pappushaare sind bei den australischen Arten zuweilen frei,bei den meisten jedoch an der Basis leicht verbunden.

Die Artbeschreibung von Helichrysum bracteatum (Vent.)Willd. bei WILLDENOW (83) lautet:"E.herbaceum erectum,foliis lanceolatis utrinque acutis scabriusculis,pedunculis unifloris elongatis,calycibus bracteatis."

Außer den beschriebenen Gattungscharakteristika ist die Pflanze durch ihren staudenartigen Wuchs mit einer Höhe von 2o bis 12o cm und ihre aufrechten,oberwärts ästigen Stengel ausgezeichnet. Die Laubblätter sind rauh,lanzettlich-spitz und am Rande etwas ausgeschweift.Die großen,zwei bis fünf cm breiten Köpfchen werden in einer lockeren Doldentraube vereinigt.Jedes Köpfchen enthält zahlreiche Scheibenblüten.Die äußeren sind rein weiblich.

Die Heimat von Helichrysum bracteatum ist Australien.H.br. hat hier gemeinsam mit den anderen Immortellen-Kompositen,zu denen außer Vertretern aus der Gattung Helichrysum auch Helipterumarten zählen,fast die ganze SW-Region okkupiert und auch die Westküste erreicht.Die Immortellen können zuweilen in solchen Mengen auftreten,daß sie für die Szenerie der ganzen Landschaft maßgebend werden.Sie bilden dann mit ihren bunten Hüllen rote,gelbe oder weiße Beete auf der sonst erdfarbenen Fläche. Bei DIELS (13) finden wir folgende Beschreibung:"Diese Hüllen (Involukren) sind es,die oft ausschließlich der Eremaea freudigen Farbschmuck verleihen.Weiß,sattes Gelb und eine konstante Nuance von Rosenrot sind die drei herrschenden Töne,die manchmal noch durch Kontrastfarben verstärkt und zu erhöhter Wirkung gebracht werden."
Die Stammform von Helichrysum bracteatum besitzt stroh- bis goldgelbe Hüllblätter,daneben gibt es eine Reihe verschiedener

Farbsorten,die bei uns gärtnerisch gezüchtet werden. Chemische Untersuchungen über die Natur der dieser Farbmannigfaltigkeit zugrunde liegenden Inhaltsstoffe liegen bisher kaum vor.

1884 untersuchte ROSOLL (67) erstmalig den gelben Farbstoff der Blütenköpfe von Helichrysum bracteatum Willd.var.monstrosum. Aus der intensiven Rotfärbung der Hüllblätter beim Eintauchen der getrockneten Blütenköpfe in eine Boraxlösung,der etwas HCl zugesetzt war,schloß er bereits,daß dieser Farbstoff nicht mit den bis dahin bekannten Blütenfarbstoffen identisch sei. Er konnte schließlich eine amorphe,harzig glänzende dunkelbraune Masse isolieren,die sich in Wasser,Alkohol,Weingeist und Äther löste und beim Behandeln mit Alkalien purpurrot gefärbt wurde.Trotz genauer Durchsicht der in der Literatur bis dahin aufgezählten Pflanzenstoffe war es ihm nicht möglich, "ein analoges Verhalten irgendeiner bereits beschriebenen Substanz auch nur annähernd zu finden."Auf Grund der Entfärbung eines durch KOH purpurrot gefärbten Auszuges durch schweflige Säure und Natriumamalgam schloß er auf das Vorliegen einer chinoiden Verbindung,für die er den Namen Helichrysin vorschlug.

192o erhielt KLEIN (5o) aus einem stark gelb gefärbten Auszug aus den Blütenköpfen von Helichrysum bracteatum mit Bleiacetat eine ziegelrote Fällung.Aus diesem Niederschlag löste Eisessig fast nur den gelben Farbstoff.Dieser stimmte in seinen Eigenschaften mit dem bereits von ROSOLL beschriebenen Helichrysin überein.Auf Grund dieser Eigenschaften konnte KLEIN (51) dies Pigment den Anthochloren der Dahliagruppe (u.a.umfassend: Dahlia,Althea,Coreopsis u.a.m.) zuordnen.Er wies auf das gemeinsame Verhalten der Anthochlorfarbstoffe und der Anthrachinonglykoside gegenüber konzentrierten Mineralsäuren und Alkalien hin und sah eine chinoide Bindung als gemeinsame Ursache für dies gleiche Verhalten beider Stoffklassen an. Nahe Beziehungen der Anthochlore zu den Anthocyanen und Flavonen wurden bereits erkannt und die Vermutung ausgesprochen, daß es sich bei den Anthochlorpigmenten um eine besondere

Gruppe von Flavonderivaten handelt,die besonders bei Arten, die rot und gelb gefärbte Varietäten aufweisen,vorkommen.

Wahrscheinlich auf Grund der Schwierigkeiten,die sich der Isolierung derartiger Stoffe entgegenstellten,wurden die Untersuchungen an Helichrysum bracteatum erst kürzlich von anderer Seite wieder aufgenommen.Mit Hilfe der neuerdings für die Trennung phenolischer Naturstoffe entwickelten Methode der präparativen Chromatographie an Polyamiden (26,27) gelang ALBRECHT (1) aus den Blütenköpfen einer gelben Sorte von Helichrysum bracteatum die Isolierung des im Pflanzenreich verbreiteten Luteolin-7-glucosid sowie eines bisher noch nicht bekannten Auronglykosids,für welches der Name Bractein vorgeschlagen wurde.(37)Dessen Konstitution konnte inzwischen als die eines 4,6,3′,4′,5′-Pentahydroxyauron-4-glucosids erkannt werden.(37,38)

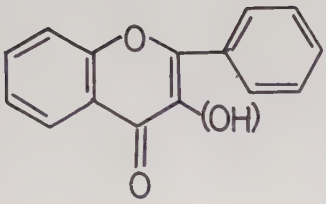
III. Eigene Untersuchungen

Für die vorliegenden Untersuchungen standen sechs Farbsorten von Helichrysum bracteatum,die wie folgt bezeichnet werden, zur Verfügung:

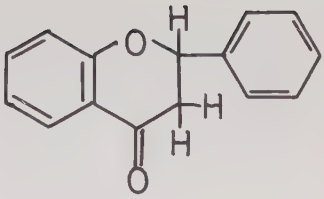
Sorte Nr. 1 weiß (album)
" " 2 gelb (luteum)
" " 3 orangerot (Fireball)
" " 4 braun (fuscatum)
" " 5 violett (purpureum)
" " 6 rosa ("Rosa Töne")

Die genannten Farbunterschiede beziehen sich ausschließlich auf die Hüllblätter,während unabhängig von deren Farbausgestaltung die Blütenkronen aller zur Verfügung stehenden Sorten einheitlich gelb gefärbt sind.Durch ein leuchtendes Gelb zeichnen sich im Falle der gelben,orangeroten und braunen Sorte auch die sonst farblosen Pappushaare aus.
Neben den genannten,teilweise schon äußerlich in ihrer Färbung so variabelen Teilen der Pflanzen werden auch die Laubblätter, Früchte und Wurzeln sämtlicher Sorten von Helichrysum bracteatum auf ihre Inhaltsstoffe hin geprüft.

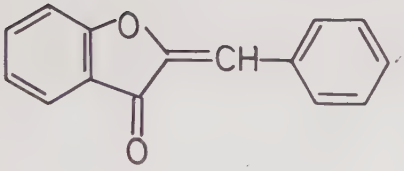
Wie in der Einleitung bereits gesagt wurde,interessieren dabei im Hinblick auf die Zielsetzung dieser Arbeit vor allem die Flavonoide sowie die mit diesen verwandten Phenylpropane vom Typ der Zimtsäure.Die einzelnen Flavonoidtypen unterscheiden sich dadurch,daß entweder die C-3-Gruppe als Kohlenstoffkette die beiden aromatischen Ringe verbindet (Chalkone) oder sie Teil eines heterocyclischen Fünfringes (Aurone) oder Sechsringes wird.Je nach dem Oxydationsgrad des heterocyclischen Sechsringes haben wir die farblosen Flavanone,die schwach bis stark gelb gefärbten Flavone,Flavonole oder die rot,blau oder violett gefärbten Anthocyanidine vor uns.Eine weitere Abwandlung erfahren diese Grundtypen durch Zahl und Stellung der Hydroxylgruppen in den beiden aromatischen Ringen sowie deren Methylierung oder Verknüpfung mit verschiedenen Zuckern und Säuren.
Die Formelbilder der oben genannten Grundtypen zeigt Abb.1.



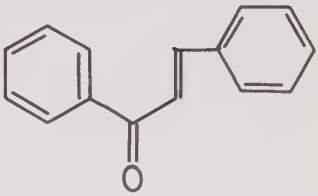
Flavon(ol)



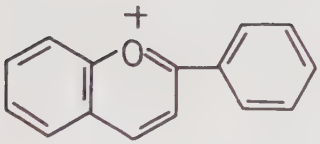
Flavanon



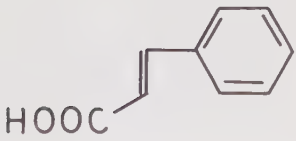
Auron



Chalkon



Anthocyanidin



Zimtsäure

Abb.1

A. Methodische Grundlagen

Dem Forschungsziel entsprechend sind also die Gesamtextrakte von insgesamt 36 Pflanzenteilen auf Flavonoide und Phenylpropane zu untersuchen mit dem Ziel,die Konstitution der jeweils vorliegenden Verbindung kennen zu lernen.
Zu diesem Zweck muß zunächst eine Trennung der Inhaltsstoffe erfolgen.Hierbei werden auch Verbindungen auftreten,die keiner der oben genannten Stoffklassen angehören.Daher muß als Nächstes der Nachweis erbracht werden,bei welchen Inhaltsstoffen es sich um Flavonoide oder Phenylpropane handelt.All diejenigen Stoffe,die sich diesen nicht zuordnen lassen,scheiden von den weiteren Untersuchungen aus.Anschließend kann dann die Identifizierung bzw. Charakterisierung der getrennten und als Flavonoide oder Phenylpropane erkannten Verbindungen durchgeführt werden.

Bei der Suche nach geeigneten Methoden bieten sich von vornherein zwei Möglichkeiten:
1.Handelt es sich um ubiquitäre Stoffe,die in der Literatur bereits häufig beschrieben wurden,so stehen für deren Trennung und Identifizierung mikroanalytische Methoden zur Verfügung, die die präparative Isolierung der Substanz erübrigen.
2.Handelt es sich dagegen um seltene oder gar noch völlig unbekannte Stoffe (die zwar nach oben genannten Methoden getrennt,jedoch nicht identifiziert werden können),dann ist deren präparative Isolierung meist unumgänglich,um die Konstitutionsaufklärung nach den in der Chemie üblichen Methoden durchführen zu können.

1. Mikroanalytische Methoden zum Nachweis,der Auftrennung und Identifizierung der Inhaltsstoffe

Wie bekannt ist,neigen gerade viele Flavonoide zu weiter Verbreitung im Pflanzenreich.Da mit dem Vorkommen derartig ubiquitärer Flavone auch in unserem Fall von vornherein gerechnet werden konnte,erschien uns als erstes die Anwendung analytischer Methoden im Mikromaßstab nach [1] sinnvoll.

a. Tüpfelreaktionen

Über das Vorhandensein oder Fehlen phenolischer und flavonoider Verbindungen in Pflanzenauszügen können schon Tüpfelreaktionen Auskunft geben.

Phenolische Stoffe,die in Nachbarstellung zur phenolischen OH-Gruppe eine weitere mit dieser zur Komplexbildung befähigte Gruppe besitzen (z.B. 3- oder 5-Oxyflavone,Flavone mit Orthodihydroxygruppierung im B-Ring),können mit E i s e n -III- c h l o r i d in methanolischer Lösung nachgewiesen werden.

Flavonoide,die im Molekül den γ-Pyronring enthalten (Flavone, Flavonole,Flavanone,3-Oxyflavanone), sind mit Magnesium und Salzsäure (R e d u k t i o n s p r o b e nach SHINODA(77)) nachweisbar.Durch dieses Reagens werden die genannten Verbindungen zu orangerot bis purpurrot gefärbten Produkten reduziert.

Anthochlore (Aurone und Chalkone) geben mit konz.S c h w e f e l s ä u r e und mit A l k a l i e n eine orangerote Färbung. Während Schwefelsäure nur in konzentrierter Form diese Färbung hervorruft,färben Laugen noch bei weitgehender Verdünnung intensiv.

b. Papierchromatographische Methoden

Zur Trennung phenolischer Pflanzeninhaltsstoffe eignet sich grundsätzlich die Papierchromatographie.Besonders über die papierchromatographische Trennung flavonoider Verbindungen gibt es eine ausgedehnte Literatur (3o,32),die bei der Ausarbeitung des Analysenganges berücksichtigt wurde.So wurde für Untersuchungen sehr komplexer Gemische bereits mehrfach die zweidimensionale Papierchromatographie mit Butanol:Eisessig:Wasser als erstem und mit 15%iger Essigsäure als zweitem Laufmittel mit Erfolg eingesetzt.Glykosidische Flavonoide mit langsamer Laufgeschwindigkeit (niedrigem RF-Wert) im ersten Gemisch wandern rasch in Essigsäure.Bei den Aglyka verhalten sich die Laufgeschwindigkeiten gerade umgekehrt. GEISSMAN und Mitarbeiter (23) konnten auf diese Weise über 3o

Inhaltsstoffe der Blüten von Coreopsis gigantea nachweisen und 11 davon einwandfrei identifizieren.Mit Ausnahme der stark gelb gefärbten Anthochlorpigmente führte die gleiche Methode auch bei der Auftrennung der Flavonoide aus Helichrysum bracteatum zum Ziel.

Während sich die Anthocyane auf dem Papierchromatogramm bereits durch ihre natürliche Färbung zu erkennen geben,werden die übrigen Flavonoide sowie die Phenylpropane erst beim Betrachten der Chromatogramme vor der Analysenquarzlampe im ultravioletten Licht deutlich sichtbar.Weiterhin werden zum Nachweis der Flavonoide auf dem Papier in der Literatur Farbreaktionen mit zahlreichen Sprühreagenzien angegeben.Die wichtigsten dieser Reaktionen beruhen auf dem Alkalisieren (Bathochromie der Phenolate) und der Chelatbildung mit Schwermetallsalzen.Die dabei auftretenden Färbungen und Fluoreszenzänderungen beim Betrachten der Chromatogramme im ultravioletten Licht sind vom Konstitutionstyp der betreffenden Verbindung abhängig. Daher ist auf diese Weise bereits die Einordnung der Flecke in die einleitend genannten Grundtypen der Flavonoide möglich. Diese seien im Folgenden nochmals mit den für sie charakteristischen Erkennungsreaktionen genannt:

F l a v o n e geben sich auf dem Papierchromatogramm im ultravioletten Licht vor der Analysenquarzlampe als braune Flecke zu erkennen.Durch Alkalisieren mit NH_3 oder durch Besprühen des Chromatogramms mit einer Lösung von KOH färben sich diese gelb bis leuchtend gelb (Bathochromie).Durch Besprühen mit Schwermetallsalzen ($AlCl_3$ oder $ZrOCl_2$) beginnen die Flavone schön gelb zu fluoreszieren (Chelatbildung).

F l a v o n o l e mit freier Hydroxylgruppe in 3-Stellung erkennt man unbesprüht bereits vor der Analysenquarzlampe an ihrem gelben Leuchten.Diese Färbung wird durch die oben genannten Reagenzien zu intensiver grüngelber Fluoreszenz gesteigert.

F l a v a n o n e sind sowohl im Tageslicht als auch im langwelligen UV-Licht farblos,absorbieren jedoch im kurzwelligen

UV-Licht in dem Wellenbereich von 25o bis 26o mμ (Purinlampe mit entspr.Emmissionsmaxima).
Durch Alkalisieren mit KOH (nicht jedoch mit NH_3) färben sich Flavanone gelb bis rötlich-braun.Nach Untersuchungen von HOROWITZ (46) nehmen Flavanone auf dem Papierchromatogramm durch Reduktion mit Natriumborhydrid und anschließendem Behandeln mit HCl rotviolette Färbungen an.Er benutzte eine alkoholische Lösung von $NaBH_4$ und methanolische HCl als Sprühreagenzien zum Nachweis von Flavanonen auf dem Papierchromatogramm.

A n t h o c y a n e geben sich auf dem Papierchromatogramm schon im Tageslicht durch ihre natürliche Färbung zu erkennen. Alkalisierende Reagenzien verschieben die roten Farbtöne der Anthocyane zum Blau hin.

A n t h o c h l o r p i g m e n t e (Aurone und Chalkone) sind ebenfalls auf dem Papierchromatogramm schon im Tageslicht unbehandelt an ihrer gelben Färbung zu erkennen.Im UV-Licht erscheinen die Aurone gelb bis gelbgrün (nach Alkalisieren orangerot),die Chalkone dunkelbraun (nach Alkalisieren intensiv rot bis tomatenrot).

P f l a n z e n s ä u r e n (Hydroxyzimtsäurederivate) und O x y c u m a r i n e leuchten im UV-Licht blau und fluoreszieren nach Behandeln mit alkalisierenden Reagenzien leuchtend blau oder grün.(32,62)

Schon durch die Einordnung der einzelnen Flecke in die jeweilige Untergruppe der Flavonoide wird der Kreis der in Betracht kommenden Verbindungen weitgehend eingeengt.Über nähere strukturelle Gruppierungen können ferner folgende Sprühreagenzien Aufschluß geben:

E i s e n -III- c h l o r i d als allgemeines Phenolreagens kann (in Anlehnung an die bereits genannte Tüpfelreaktion) auch zum Sichtbarmachen der Flecke auf dem Papierchromatogramm im Tageslicht herangezogen werden.Genauere Aussagen über den vorliegenden Substitutionstyp lassen die grünen bis braunschwarzen Mischfarben jedoch nicht zu.Sie können nur erste Hin-

weise geben.Nach BRIGGS und LOCKER (1o) sollen 6-,7- oder 4'-Oxyflavone mit Eisen-III-chlorid nicht in Reaktion treten, während 3-,5- und 8-Oxyflavone mit diesem Reagens verschieden gefärbte Komplexe bilden.Eine tiefblaue Färbung soll für vicinale OH-Gruppen im B-Ring der Flavonoide sprechen.(3o)

B e n e d i k t s R e a g e n s nach GAGE et al.(19) ist ebenfalls zum Sichtbarmachen von Flavonoiden auf dem Papierchromatogramm geeignet.Es handelt sich um einen basischen Kupfercitratkomplex in wässriger Lösung.Nach Untersuchungen von REZNIK und EGGER (64) erfährt die Fluoreszenz phenolischer Fluorochrome bei Anregung mit UV-Licht durch dieses Reagens charakteristische strukturabhängige Veränderungen.Beim Vorliegen von Orthodihydroxygruppen erlischt die Fluoreszenz nach Besprühen mit Benedikts Reagens,trägt dagegen eine Verbindung nur isolierte Hydroxyle,so wird die Fluoreszenz gesteigert.REZNIK und EGGER (64) nehmen an,daß nur Stoffe mit Orthodihydroxygruppen in der Lage sind,das Cu-Ion aus dem Citratkomplex zu verdrängen und selbst damit stabilere Komplexe zu bilden,die nicht mehr fluoreszieren.

N a t u r s t o f f r e a g e n s A nach NEU (57-59) = Diphenylborsäureaminoäthylesterkomplex gibt u.a. mit Oxyderivaten von Phenylbenzo-γ-pyronen unterschiedliche Farbtöne, die von der Konstitution der vorliegenden Verbindung abhängig sind.Da dieses Reagens beim Besprühen der Chromatogramme eine besonders breite Farbskala umfaßt,wurde es in der vorliegenden Arbeit dort eingesetzt,wo es auf eine deutliche Differenzierung nahe beieinander liegender Flecke auf dem Chromatogramm ankam.

D i a z o v e r b i n d u n g e n kuppeln auf dem Papier auch mit den mit $FeCl_3$ nicht reagierenden phenolischen Verbindungen, sofern diese freie Oxygruppen aufweisen.Dabei entstehen gelbe bis rote Oxyazoverbindungen.Verwendung finden diazotiertes p-Nitranilin sowie Echtschwarzsalz K.(3o)

Neben den genannten Farbreaktionen ist bei der Identifizierung flavonoider Verbindungen,wie die aufschlußreichen Untersuchungen von BATE-SMITH und WESTALL (5) über das papierchromatographische Verhalten flavonoider Verbindungen in Abhängigkeit von

bestimmten strukturellen Gruppierungen zeigen,die Auswertung der RF-Werte von großem Nutzen.Diese können Hinweise auf die Glykosidnatur sowie die Anzahl der Methoxyl- und Hydroxylgruppen im Molekül liefern.
Oft wird die Identifizierung der Glykoside durch die vorherige Identifizierung der Genine erleichtert;denn wie bekannt ist, lassen sich vielfach mehrere in einer Pflanze enthaltene Glykoside vom gleichen Aglykon ableiten,da durch Zahl und Stellung der Zuckeranteile große Variationsmöglichkeiten gegeben sind.Durch chromatographischen Vergleich eines Gemischs vor und nach Freisetzung der Genine kann dann vielfach die Zuordnung der Aglyka zu den entsprechenden Glykosiden erfolgen. Die Bedingungen, unter denen die Spaltung eines Glykosids in sein Genin und Zuckeranteil eintritt,sind oft von der Stellung des Zuckers im Molekül abhängig.Daher liefert die Auswertung der unter verschiedenen Hydrolysebedingungen erhaltenen Ergebnisse oft wertvolle Hinweise bei der Identifizierung.
An Hand der so gewonnenen Anhaltspunkte (Farbreaktionen,RF-Werte vor und nach Hydrolyse der zu prüfenden Substanz oder des Substanzgemischs) kann dann ein Vergleich mit den in der Literatur angegebenen Daten erfolgen.Gerade über das papierchromatographische Verhalten der am häufigsten vorkommenden Flavonoide finden sich in der Literatur einige ausführliche Tabellen.(3o,32)Auf diese Weise gelingt dann in vielen Fällen durch Mitlaufenlassen der in Frage kommenden Vergleichsproben die Identifizierung der Inhaltsstoffe.

Selten kann der Gesamtextrakt direkt chromatographiert werden, denn häufig machen sich bei derartigen Identitätsprüfungen fremde Extraktivstoffe störend bemerkbar.Diese verursachen dann RF-Wertdepressionen;trotz Identität der zu prüfenden Substanz und der Vergleichsprobe weisen beide verschiedene RF-Werte auf.In derartigen Fällen wird empfohlen (32), die zu prüfende Substanz mikropräparativ auf papierchromatographischem Wege abzutrennen (Eluieren aus Bandchromatogrammen) und erst die so angereicherte Lösung mit der authentischen Probe zu vergleichen.

Mitunter zeigen auch verschiedene Substanzen in zwei Lauf-

mitteln keine merklichen Laufunterschiede und können erst in einem dritten Gemisch deutlich unterschieden werden.Daher wurde auch in der vorliegenden Arbeit die Identität zweier Verbindungen erst dann als erwiesen angesehen,wenn sie außer gleichem Farbverhalten auf dem Papierchromatogramm mindestens in drei unterschiedlichen Laufmitteln identische RF-Werte besaßen.

c. Dünnschichtchromatographische Methoden (38)

Obwohl sich die Anthochlore (Aurone und Chalkone) als phenolische Substanzen mit Hilfe der papierchromatographischen Technik trennen lassen sollten,hatte diese Methode bei der Trennung der Anthochlorpigmente aus Helichrysum bracteatum versagt.Da die Aurone und Chalkone im Pflanzenreich relativ wenig verbreitet vorkommen,stehen demzufolge auch wenig Methoden zu ihrer Auftrennung zur Verfügung.Bei der Suche nach einer für unsere Zwecke geeigneten Methode erschien uns die Dünnschichtchromatographie nach STAHL (79),die in letzter Zeit auch für die Trennung phenolischer Substanzen immer mehr Bedeutung erlangte,besonders erfolgversprechend.Da jedoch über das dünnschichtchromatographische Verhalten der Anthochlore nichts bekannt war,verglichen wir zunächst das Verhalten einer Reihe synthetisierter Aurone und Chalkone[1] auf dem Dünnschichtchromatogramm und erhielten folgende Ergebnisse:
Geeignete Laufmittel (unter den im Versuchsteil angegebenen Bedingungen) für hydroxylierte und methoxylierte Aurone sind Gemische von aliphatischen Estern mit einem lipophilen Lösungsmittel unter Zusatz von Ameisensäure.Bei den entsprechenden Chalkonen eignete sich besser ein Laufmittel ohne Säurezusatz,das dagegen mit einem Formamid-Wasser-Gemisch gesättigt ist.
Die beobachteten Gesetzmäßigkeiten waren bei beiden Stoffgruppen die gleichen.Mit zunehmenden hydrophilen Eigenschaften einer Substanz sinkt deren RF-Wert.Die stark hydrophilen An-

---

1) Für die Überlassung der synthetisierten Aurone danke ich an dieser Stelle Frau Dr.L.Langhammer,Inst.f.Pharmakognosie der FU-Berlin (37),für die Überlassung der synthetisierten Chalkone Herrn G.Ranft,Inst.f.Pharmakognosie der FU Berlin.

thochlorglykoside bleiben in den verwendeten Laufmitteln (siehe experimenteller Teil!) am Startpunkt zurück.Für deren Trennung eignet sich das bereits von STAHL (79) zur Trennung von Flavonglykosiden benutzte Gemisch Äthylacetat:Äthylmethylketon:Ameisensäure:Wasser.

Wie aus Abb.2 ersichtlich ist,haben Anzahl und Stellung der Substituenten im Auronmolekül einen deutlichen Einfluß auf den RF-Wert;und zwar:
1.Eine zusätzliche OH-Gruppe im Molekül erniedrigt den RF-Wert beträchtlich.
2.Eine zusätzliche Methoxylgruppe übt dagegen nur einen geringen Einfluß auf den RF-Wert aus.Es gilt:

$$R_F(\text{Auron-OH}) \ll R_F(\text{Auron-OCH}_3) < R_F(\text{Auron-H})$$

Diese Gesetzmäßigkeiten gestatten es,aus der Höhe eines unbekannten Auronderivates Rückschlüsse auf dessen Konstitution zu ziehen.Da die absoluten Zahlenwerte hier noch größeren Schwankungen als bei der Papierchromatographie unterliegen, sollte stets der relative RF-Wert (Vergleich mit einer bekannten Substanz) bestimmt werden.

Aurone und Chalkone unterscheiden sich durch ihr Farbverhalten im UV-Licht:Sämtliche von uns untersuchten Aurone fluoreszieren im UV-Licht auf dem Dünnschichtchromatogramm gelb bis leuchtend gelb-grün,die Chalkone hingegen geben sich durch dunkelbraune Farbe zu erkennen.Unter dem Einfluß von Ammoniakdämpfen färben sich die Chalkone tiefrot ,die Aurone orange. Das Verhalten der geprüften Chalkone auf dem Dünnschichtchromatogramm zeigt Tab.1.
Es soll noch darauf hingewiesen werden,daß farbliche Unterschiede nach Behandeln mit Sprühreagenzien auf dem Papierchromatogramm deutlicher zum Ausdruck kommen als auf dem Dünnschichtchromatogramm.Für diesen Nachweis empfiehlt es sich daher,ein Stoffgemisch zunächst dünnschichtchromatographisch mit Hilfe eines Streifenchromatogramms zu trennen,die gewünschte Zone mit Methanol zu eluieren und erst dann das Pa-

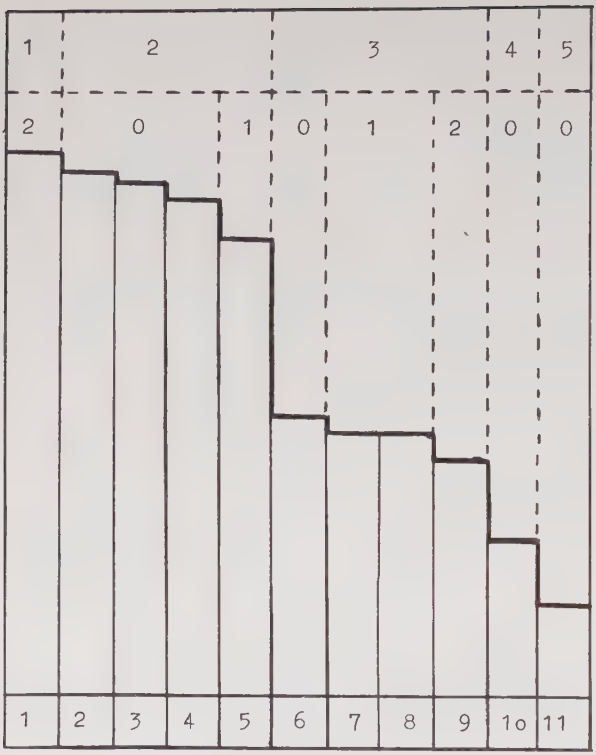


Abb.2 Graphische Darstellung der RF-Werte der Aurone (1-11) in Abhängigkeit von der Anzahl und der Stellung der Hydroxyl- und Methoxylgruppen. Laufmittel: Benzol: Essigester: Ameisensäure (4,5:3,5:2).

1 =	6	-OH	3',4'	$-OCH_3$	-Auron
2 =	6,2'	-OH			"
3 =	6,3'	-OH			"
4 =	6,4'	-OH			"
5 =	6,4'	-OH	3'	$-OCH_3$-	"
6 =	6,3',4'	-OH			"
7 =	4,6,3'	-OH	4'	$-OCH_3$-	"
8 =	4,6,4'	-OH	3'	$-OCH_3$-	"
9 =	4,6,4'	-OH	3',5'	$-OCH_3$-	"
1o =	4,6,3',4'	-OH			"
11 =	4,6,3',4',5'	-OH			"

pierchromatogramm dieses Eluates mit den in Frage kommenden Reagenzien zu besprühen.
Auf diese Weise gelingt dann in vielen Fällen auch die Identifizierung der Stoffe nach den bereits beschriebenen Methoden.

Anzahl und Stellung der Substituenten		RF-Wert
-OH	$-OCH_3$	
2′	-	o,77
2′	4′,6′	o,46
2′	4,4′,6′	o,27
2,2′	-	o,24
2′	3,4	o,22
2′,4	-	o,18
2′,4′	-	o,18
2′,3	4	o,13
2′,4′	4	o,13
2′,3′,4′	-	o,03

Tab.1 RF-Werte der Chalkone in Abhängigkeit von der Anzahl und der Stellung der Hydroxyl- und Methoxylgruppen.Laufmittel:Cyclohexan/Essigester(7:1),gesättigt mit Wasser und Formamid.

2. Methoden zur präparativen Isolierung der Inhaltsstoffe für deren Identifizierung nach den in der Chemie üblichen Methoden

Wie zu erwarten, gelang die Identifizierung der meisten Inhaltsstoffe aus Helichrysum bracteatum mit Hilfe der im vorigen Kapitel beschriebenen mikroanalytischen Methoden, von wenigen Ausnahmen abgesehen. In diesen Fällen wurde die präparative Isolierung der betreffenden Substanzen nach [2] notwendig.

a. Säulenchromatographische Trennung phenolischer Stoffe an Polyamiden

Für die präparative Trennung phenolischer Substanzen ist, wie die grundlegenden Untersuchungen von GRASSMANN (26,27) zeigen, die Säulenchromatographie an Polyamiden geeignet. HÖRHAMMER und WAGNER trennten auf diese Weise mehrere pharmakologisch bedeutungsvolle Pflanzenextrakte. ALBRECHT (1) konnte mit Hilfe dieser Methode bereits mehrere Inhaltsstoffe aus der gelben Sorte von Helichrysum bracteatum isolieren.

Auf Grund von Wasserstoffbrückenbildung werden phenolische Substanzen aus wässriger Lösung von Polyamiden zurückgehalten. Wie durch Messungen an Modellsubstanzen gezeigt werden konnte (27), ist die Bindungsenergie zwischen den einzelnen Molekülketten des Polyamids weit geringer als die Wasserstoffbrückenbindung einer phenolischen Hydroxylgruppe an den Amidsauerstoff. Daher brechen phenolische Verbindungen als starke Brückenbildner die Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb des Polyamids, die dessen Zusammenhalt bewirken, auf und dringen selbst in das Innere des Polyamids ein.
Für die Chromatographie von Bedeutung ist, daß verschiedene Phenole ein unterschiedliches Sorptionsverhalten zeigen. Dies wird damit erklärt, daß aus räumlichen Gründen in der Regel bei ortho-ständigen Hydroxylen nur eine phenolische OH-Gruppe für die Bindung an das Polyamid in Betracht kommt. Die restlichen Hydroxyle wirken als hydrophile Gruppen, die die Affinität zur wässrigen Phase steigern und damit die Sorption

herabsetzen.Eine zweite oder dritte Hydroxylgruppe im aromatischen Kern in meta- oder para-Stellung dagegen erhöht im Allgemeinen die Haftfestigkeit der betreffenden Substanz an dem Polyamid.
Für die chromatographische Auftrennung eines Substanzgemischs an der Säule verwendet man zunächst zweckmäßig Wasser, da die Substanzen in diesem Lösungsmittel sehr langsam wandern.Die Elution gelingt zwar ebenfalls durch genügend langes Nachwaschen mit Wasser,doch können die einzelnen Fraktionen wesentlich schneller und konzentrierter durch Elution mit organischen Lösungsmitteln (am besten mit Methanol) gewonnen werden.Mit verdünnter Natronlauge werden die Phenole sofort eluiert,da Phenolationen keine Wasserstoffbrücken mehr zum Polyamid bilden können.

Die Chromatographie an Polyamid ist den rein adsorptionschromatographischen Methoden insofern weit überlegen,als die Substanzen auch im Inneren des Polyamids reversibel zurückgehalten werden und sich damit die Kapazität des Füllmaterials in der Säule beträchtlich erhöht.

Ist es gelungen,mit Hilfe der beschriebenen Methode Inhaltsstoffe in kristalliner Form zu isolieren,so stehen Methoden für deren Identifizierung bzw. Strukturaufklärung zur Verfügung.Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen spielten vor allem UV-Absorptionsmessungen,Alkalispaltung u.a.m., wie an entsprechender Stelle gezeigt wird,eine Rolle.

B. Die Verteilung der Inhaltsstoffe auf die verschiedenen Pflanzenteile der unterschiedlichen Farbsorten von Helichrysum bracteatum

1. Vorproben

Wie Tabelle 2 zeigt, fiel die Probe auf phenolische Inhaltsstoffe mit $FeCl_3$ bei den Hüllblättern, Laubblättern, Früchten, Wurzeln und Pappushaaren[1] sämtlicher Sorten positiv aus. Flavone konnten mit Mg und HCl in den Laubblättern[1], Pappushaaren[1] sämtlicher Sorten sowie den Hüllblättern der weißen und gelben Sorte nachgewiesen werden. Wegen der starken Eigenfärbung der Extrakte war dieser Nachweis bei den Hüllblättern der übrigen Sorten nicht durchführbar.
Die intensive Rotfärbung der methanolischen Auszüge aus den Hüllblättern und Pappushaaren der gelben, orangeroten und braunen Sorte nach Zugabe von konz. Schwefelsäure und KOH spricht für das Vorhandensein von Anthochloren.

	Wurzeln, Früchte	Laub-blätter		Pappushaare			Hüllblätter				Blüten-kronen
	Sorte Nr. 1-6	Sorte Nr. 1	2-6	Sorte Nr. 1	2-4	5-6	Sorte Nr. 1	2	3-4	5-6	Sorte Nr. 1-6
a)	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	0
b)	0	0	+	0	+	+	+	+	−	−	0
c)	0	0	0	0	+	0	0	+	+	0	0

Tab. 2 Ergebnis der Prüfung der methanolischen Gesamtextrakte mit:
a) $FeCl_3$ auf phenolische Inhaltsstoffe
b) Mg und HCl auf Flavone
c) konz. H_2SO_4 und KOH auf Anthochlore

+ = positiv
0 = negativ
− = nicht geprüft

---

[1] mit Ausnahme derjenigen der weißen Sorte

2. Papier- und dünnschichtchromatographischer Vergleich der Gesamtextrakte

Der papier- und dünnschichtchromatographische Vergleich der Gesamtextrakte (Abb.3 und 4) gestattete den Nachweis von 16 Inhaltsstoffen,die den Flavonoiden oder Phenylpropanen zugeordnet werden konnten.Dabei treten sämtliche Verbindungen in wechselnder Konzentration in mehreren der untersuchten Pflanzenteile auf.Die Einordnung der papier- und dünnschichtchromatographisch getrennten Flecke in die jeweilige Untergruppe der Flavonoide gelang auf Grund der Farbreaktionen mit den bereits genannten Sprühreagenzien.Wie die Abbildungen 3 und 4 zeigen,verteilen sich die Inhaltsstoffe wie folgt auf die verschiedenen Pflanzenteile der einzelnen Sorten:

Drei C-6-C-3-Körper vom Typ der Zimtsäure oder Cumarine enthalten die Wurzeln,Früchte,Laubblätter sämtlicher Sorten sowie die Hüllblätter der weißen Sorte.

Flavone in wechselnder Konzentration und Zahl finden wir in den Laubblättern [1],Pappushaaren[1] und Hüllblättern aller Sorten.

Drei Anthochlore (Aurone und Chalkone) treten zusätzlich in den Pappushaaren und Hüllblättern der gelben,orangeroten und braunen Sorte auf.

Anthocyan führen nur die Hüllblätter der orangeroten,braunen, violetten und rosafarbenen Sorte.

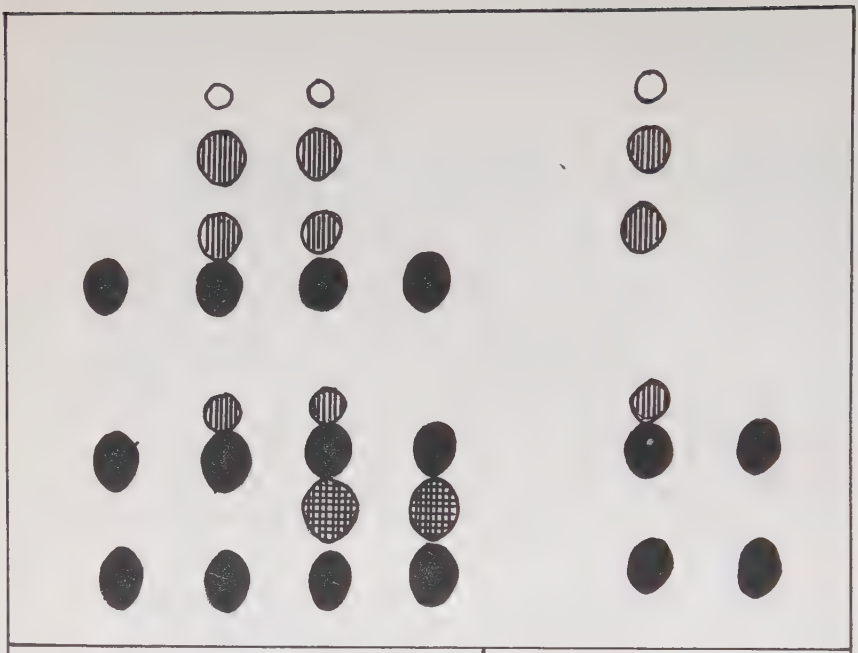
Keine phenolischen Inhaltsstoffe konnten in den Blütenkronen sämtlicher Sorten nachgewiesen werden.Aus diesem Grunde schieden die Blüten von den weiteren Untersuchungen aus.

Erklärung zu Abb.4 : Vergleich der Gesamtextrakte mit Hilfe der zweidimensionalen Papierchromatographie mit den Laufmitteln Butanol:Eisessig:Wasser und 15%iger Essigsäure.

= Flavone
= Flavonole
= Flavanone
= Anthocyane
= Phenylpropane
= Anthochlore
= unbekannte Stoffgruppe

---

[1] mit Ausnahme derjenigen der weißen Sorte



Hüllblätter der Sorten:				Pappushaare der Sorten:		
weiß	gelb	orange-rot, braun	violett, rosa	weiß	gelb, orange-rot, braun	violett, rosa

Abb.3 Schematische Darstellung der dünnschichtchromatographischen Trennung der Gesamtextrakte aus den Hüllblättern und den Pappushaaren der verschiedenen Farbsorten von Helichrysum bracteatum (Vent.)Willd. auf Kieselgel-G in dem Laufmittel Äthylacetat:Äthylmethylketon: Ameisensäure:Wasser.

Zeichenerklärung:

Anthochlorpigmente

Anthocyane

Flavone

unbekannte Stoffklasse

WEIß
GELB
ORANGEROT
BRAUN
VIOLETT
ROSA TÖNE
FRÜCHTE
PAPPUSHAARE
HÜLLBLÄTTER
LAUBBLÄTTER
WURZELN

Abb.4

C. Identifizierung bzw. Charakterisierung der Inhaltsstoffe

Die Identifizierung bzw. Charakterisierung der einzelnen Inhaltsstoffe wurde durch den Umstand,daß diese jeweils in mehreren der geprüften Extrakte wiederkehrten,wesentlich erleichtert;denn wir konnten uns daher bei den weiteren Untersuchungen auf einige wenige Extrakte beschränken.Deren Auswahl erfolgte nach den folgenden Gesichtspunkten: Die zu prüfende Substanz mußte in möglichst hoher Konzentration vorliegen,dagegen durften nur wenig störende Begleitsubstanzen vorhanden sein.

1. Anthocyane

a. Vergleich des Hydrolyseprodukts von Fleck 1o mit Cyanidin

So eignete sich zur Identifizierung der Anthocyane der salzsaure Methanolextrakt aus den Hüllblättern der violetten Sorte von Helichrysum bracteatum besonders,da hier die Anthocyankonzentration groß,die der Flavone dagegen relativ niedrig war.Anthochlore,die die Untersuchungen stören konnten,waren keine vorhanden.

	vor Hydrolyse	nach Hydrolyse	authent. Cyanidin
RF a)	o,71	o,51	o,51
RF b)	o,23	o,79	o,79
RF c)	o,81	o,58	o,58
RF d)	o,26	-	-
Farbe TL	violett	rosa	rosa
NH_3 TL	blau	blau	blau

Tab.3 Chromatographischer Vergleich des Anthocyan aus den Hüllblättern der violetten Sorte (vor und nach Hydrolyse) mit authentischem Cyanidin

a) Eisessig:Wasser:HCl (3o:1o:3) Papierchromatographie
b) Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5) " "
c) Essigsäure:Wasser (6:4) " "
d) Äthylacetat:Äthylmethylketon:Ameisensäure:Wasser(5:3:1:1) Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G

Für die papierchromatographische Identitätsprüfung wurden die schon von BATE-SMITH (4) zur Chromatographie der Anthocyane empfohlenen Laufmittel Butanol:Eisessig:Wasser sowie das FORESTALgemisch (Eisessig:Wasser:Salzsäure) herangezogen. Zusätzlich verwendeten wir 6o%ige Essigsäure. Für die Chromatographie der Anthocyanine (Glykoside) eignet sich darüberhinaus die Dünnschichtchromatographie nach STAHL (79).

Es konnte nachgewiesen werden, daß in den Hüllblättern der orangeroten, braunen, violetten und rosafarbenen Sorte von Helichrysum bracteatum lediglich ein Glykosid in wechselnder Konzentration vorhanden ist. Nach halbstündiger Hydrolyse in 2n HCl enthielten die Amylalkoholausschüttelungen ein Anthocyanidin (Aglykon), das durch chromatographischen Vergleich als Cyanidin identifiziert werden konnte (Tab.3).

2. Flavone und Flavonole

Zur Identifizierung der Flavone wurden die Gesamtextrakte der Hüll- und Laubblätter der rosafarbenen Sorte von Helichrysum bracteatum herangezogen.

a. Vergleich der Aglyka (Fleck 6 und 7) mit Luteolin und Quercetin

Wie aus der Übersicht in Abb.4 zu entnehmen ist, treten zwei Flecke mit hohem RF-Wert in Butanol:Eisessig:Wasser und mit niedrigem RF-Wert in 15%iger Essigsäure auf (Fleck 6 und 7). Diesem Verhalten nach war anzunehmen, daß es sich um Aglyka handelt. Beide Substanzen konnten mit Äther aus der wässrigen Lösung ausgeschüttelt werden und erwiesen sich papierchromatographisch als identisch mit Luteolin und Quercetin (Tab.4).

b. Identifizierung von Fleck 4 und 5 als Luteolin-7-glucosid und ein Apigeninglykosid

Die (nach Entfernung der Aglyka aus dem Hüllblattextrakt) glykosidhaltigen wässrigen Auszüge der Hüllblätter und der Laubblätter zeigten auf dem zweidimensionalen Papierchromatogramm mit Butanol:Eisessig:Wasser als erstem und 15%iger

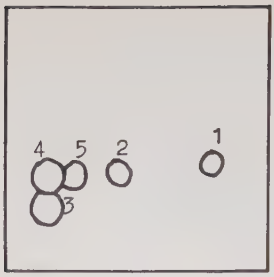


Abb.5a

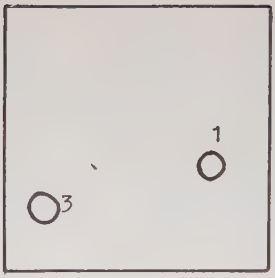


Abb.5b

Papierchromatographischer Vergleich der glykosidhaltigen wässrigen Gesamtextrakte aus den Hüllblättern (Abb.5a) und den Laubblättern (Abb.5b) der rosafarbenen Sorte von Helichrysum bracteatum vor der Hydrolyse

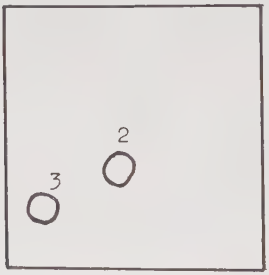


Abb.5c

Papierchromatographische Auftrennung der glykosidhaltigen wässrigen Gesamtextrakte aus den Hüllblättern (Abb.5c) und den Laubblättern (Abb.5c) der rosafarbenen Sorte von Helichrysum bracteatum nach der Hydrolyse

Essigsäure als zweitem Laufmittel das in Abb.5a und b wiedergegebene Bild,wobei lediglich die Flavone in die Darstellungen aufgenommen sind.Nach milder Säurehydrolyse (n/2 HCl, 1o Minuten) waren -nach Ausschütteln der Hydrolysate mit Äther- sowohl in der wässrigen Lösung der Hüll- als auch der Laubblätter übereinstimmend die in Abb.5c gezeigten beiden Flecke 2 und 3 nachzuweisen.Jedoch traten nach der Hydrolyse lediglich in den Ätherausschüttelungen der Hüllblätter zwei Aglyka auf,die auf Grund ihrer RF-Werte,ihres

Farbverhaltens gegenüber mehreren Sprühreagenzien sowie durch Mitlaufenlassen entsprechender Vergleichssubstanzen als Luteolin und Apigenin identifiziert werden konnten (Tab.4).Der Vergleich der Gesamtextrakte vor und nach der Hydrolyse (Abb.5a,b und c) zeigt,daß die beiden Aglyka den Glykosidflecken 4 und 5 entsprechen müssen,da diese nach der Hydrolyse nicht mehr auftreten.
Das Besprühen der Flecke 4 und 5 mit Benedikts Reagens ergab im Falle von Fleck 4 eine Fluoreszenzlöschung,während im Gegensatz hierzu bei Fleck 5 eine deutliche Steigerung der Fluoreszenz eintrat (Tab.5).Nach dem im methodischen Teil bereits Ausgeführten zeigt Fluoreszenzlöschung Orthodihydroxygruppierung an,während Fluoreszenzsteigerung für isolierte Hydroxyle im Molekül spricht.Demzufolge muß das nach der Hydrolyse erhaltene Apigenin dem Glykosid 5,das Luteolin dem Glykosidfleck 4 des unhydrolysierten Extrakts der Hüllblätter zugeordnet werden.Übereinstimmend mit dieser Annahme zeigt auch das nach der Hydrolyse erhaltene Luteolin (mit 3',4'-Dihydroxygruppierung im Seitenphenyl)- wie Fleck 4- gegenüber Benedikts Reagens deutliche Fluoreszenzlöschung,während das nach der Hydrolyse in den Ätherausschüttelungen nachweisbare Apigenin -wie auch Fleck 5- durch dieses Reagens eine Fluoreszenzsteigerung erfährt.

Bereits ALBRECHT (1) konnte in den Blütenköpfen der gelben Sorte von Helichrysum bracteatum Luteolin-7-glucosid nachweisen.Durch chromatographischen Vergleich des Eluats von Fleck 4 mit Luteolin-7-glucosid konnte die Identität des Fleckes 4 mit dem bereits von ALBRECHT nachgewiesenen Luteolin-7-glucosid sichergestellt werden.

c. Identifizierung von Fleck 1 als ein Glykosid des Homo-Orientin sowie Fleck 2 und 3 als Homo-Orientin u.Orientin

Während für die Glykosidflecke 4 (Luteolin-7-glucosid) und 5 (ein Apigeninglykosid) die entsprechenden Aglyka in den Ätherausschüttelungen nach der Hydrolyse nachgewiesen werden konnten,war dies im Falle von Fleck 1,2 und 3 nicht

möglich.Allerdings trat Fleck 1 schon nach milder Hydrolyse nicht mehr auf,dafür war aber in der wässrigen Phase der Laubblätter Fleck 2 neu entstanden.Der Fleck 3 dagegen blieb in beiden Fällen (in den Laub- und Hüllblattextrakten) unverändert erhalten.Flavonglykosid 1 konnte unter milden Hydrolysebedingungen also in Fleck 2,der sich auf Grund seines chromatographischen Verhaltens (niedrigerer RF-Wert als Fleck 1 in 15%iger Essigsäure) als weniger hydrophil erwies,überführt werden.Dieser ließ sich nicht,wie man es eigentlich von einem Aglykon erwarten sollte,mit Äther ausschütteln.Deshalb vermuteten wir zunächst,daß es sich im Fall von Fleck 1 um ein Diglykosid handeln könnte,wobei unter den angegebenen Hydrolysebedingungen nur einer der beiden Zucker abgespalten wurde.Ist diese Annahme richtig,dann müßte unter energischen Hydrolysebedingungen des Eluats von Fleck 2 die endgültige Spaltung zum Aglykon erfolgen.Der Nachweis eines Aglykons gelang uns aber nicht;jedoch war bereits nach zweistündigem Kochen in 1n HCl neben Fleck 2 in gleicher Stärke Fleck 3 auf dem Chromatogramm nachzuweisen.Die RF-Werte beider Flecke waren weniger unterschiedlich als man es von einem Glykosid und dessen Aglykon erwarten würde.Nach achtstündigem Kochen in 2n HCl begannen sich beide Flecke zu zersetzen.

Nach Eluieren von Fleck 3 aus dem Streifenchromatogramm wurde das Eluat den gleichen Bedingungen (achtstündiges Kochen in 2n HCl,um jedoch Zersetzung zu vermeiden bei 110°C auf dem Zinkbad) wie das Eluat von Fleck 2 unterworfen. Dabei war aus Fleck 3 teilweise wieder Fleck 2 entstanden. Es handelt sich demzufolge bei den Flecken 2 und 3 um zwei Substanzen,die durch Kochen mit HCl ineinander überführt werden können.

Eine Verbindung mit entsprechenden Eigenschaften wie das dem Fleck 3 entsprechende Flavon wurde erstmalig von HÖRHAMMER (43) in Polygonum orientale nachgewiesen und als Orientin beschrieben.Es konnte gezeigt werden,daß es sich

um eine Glykosylverbindung des Luteolin handelt.Der Glykosylrest,der sich in 6- oder 8-Stellung befindet,kann in zwei verschiedenen Formen auftreten,die ebenfalls durch Kochen mit starker Säure ineinander überführbar sind.Das unter diesen Bedingungen aus dem Orientin entstehende Produkt bezeichneten die Autoren als Homo-Orientin.Worauf die Unterschiedlichkeit dieser beiden Formen beruht,konnte noch nicht endgültig geklärt werden.Die zunächst von SEIKEL und GEISSMAN (72) aufgestellte und von HÖRHAMMER (45) übernommene Hypothese, es handle sich bei der Umwandlung um eine reversible Hydratisierung im Zuckeranteil des Moleküls, erwies sich als unhaltbar.Neuere Untersuchungen von KOEPPEN (52) deuten darauf hin,daß die Isomerisierung durch einen Konfigurationswechsel an einem asymmetrischen C-Atom des Glykosylrests erfolgt.

Da in Helichrysum bracteatum sowohl Luteolin als auch Luteolin-7-glucosid auftritt,lag der Gedanke natürlich nahe, daß die entsprechenden Glykosylverbindungen des Luteolin auch hier vorkommen.Deshalb wurde sowohl durch Cochromatographie als auch durch chromatographischen Vergleich der Eluate von Fleck 2 und 3 mit authentischem Homo-Orientin und Orientin[1)] geprüft,ob die Flecke 2 und 3 mit diesen Vergleichssubstanzen übereinstimmen.Wie aus Tab.5 ersichtlich ist,fiel diese Prüfung positiv aus,so daß zusammenfassend gesagt werden kann:Fleck 1 erwies sich als ein Glykosid des Homo-Orientin,während die Flecke 2 und 3 mit Homo-Orientin und Orientin identisch sind.

---

1) Authentisches Orientin (isoliert aus Oxalis cernua) stellte uns Herr Prof.SHIMOKORIYAMA,Tokio,authentisches Homo-Orientin (isoliert aus Vitex agnus castus) Herr RIMPLER,Berlin,zur Verfügung.Beiden Herrn möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung der Vergleichssubstanzen danken.

		vor Hydrolyse		nach Hydrolyse		Vergleichsproben		
		F_6	F_7	1	2[1)]	Luteolin	Apigenin	Quercetin
RF a)		o,76	o,67	o,76	o,87	o,76	o,87	o,67
RF b)		o,7o	o,61	o,7o	o,89	o,7o	o,89	o,61
RF c)		o,35	o,19	o,35	o,54	o,35	o,54	o,19
unbeh.	TL	-	s.g.	-	-	-	-	s.g.
	UV	br.	g.	br.	br.	br.	br.	g.
NH_3	TL	s.g.	g.	s.g.	-	s.g.	-	g.
	UV	g.	l.g.	g.	g.	g.	g.	l.g.
KOH	UV	l.g.	l.g.	l.g.	l.g.	l.g.	l.g.	l.g.
$ZrOCl_2$	UV	l.g.	g.fl.	l.g.	l.g.	l.g.	l.g.	g.fl.
B.R.	UV	fll.	fll.	fll.	fl.st.	fll.	fl.st.	fll.
$FeCl_3$	TL	d.gr.	gr.	d.gr.	s.gr.	d.gr.	s.gr.	gr.

Tab.4 Papierchromatographischer Vergleich der vor und nach der Hydrolyse in den Ätherausschüttelungen nachweisbaren Flavon(ol mit authentischem Luteolin,Apigenin und Quercetin

Zeichenerklärung:

a) Isopropanol:Wasser (6:4)
b) Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5)
c) Isopropanol:Ameisensäure:Wasser (2:5:5)

B.R. = Benedikts Reagens TL = Tageslicht UV = UV-Licht

br. = braun l. = leuchtend gr. = graugrün
fl. = fluoreszierend fll. = Fluoreszenzlöschung
fl.st. = Fluoreszenzsteigerung

---

1) = geringe Konzentration

		vor Hydrolyse					nach Hydrolyse		Vergleichsproben		
		F_1	F_2	F_3	F_4	F_5	F_2	F_3	Homo-Orientin	Orientin	Luteolin-7-glucosid
RF a)		o,64	o,27	o,13	o,11	o,14	o,27	o,13	o,27	o,13	o,11
RF b)		o,35	o,38	o,26	o,37	o,37	o,38	o,26	o,38	o,26	o,37
RF c)		-	o,69	o,48	o,47	-	o,69	o,48	o,69	o,48	o,47
unbeh.	TL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	UV	br	br	br	br	br	br	br	br	br	br
NH_3	TL	s.g.	s.g.	s.g.	s.g.	s.g.	s.g.	s.g.	s.g.	s.g.	s.g.
	UV	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
KOH	UV	l.g	l.g.	l.g	l.g	l.g	l.g	l.g	l.g	l.g	l.g
$ZrOCl_2$	UV	l.g	l.g	l.g	l.g	l.g	l.g	l.g	l.g	l.g	l.g
B.R.	UV	fll.	fll.	fll.	fll.	fl.st.	fll.	fll.	fll.	fll.	fll.
$FeCl_3$	TL	gr	gr	gr	d.gr	sgr.	gr	gr	gr	gr	d.gr

Tab.5 Papierchromatographischer Vergleich der vor und nach der Hydrolyse in den wässrigen Phasen nachweisbaren Flavone (Glykoside) mit authentischem Homo-Orientin, Orientin und Luteolin-7-glucosid

Zeichenerklärung:

F_1 = Fleck 1 auf dem zweidimensionalen Papierchromatogramm
a) = 15%ige Essigsäure
b) = Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5)
c) = Isopropanol:Ameisensäure:Wasser (2:5:5)

B.R. = Benedikts Reagens TL = Tageslicht UV = UV-Licht

br = braun g = gelb s = schwach l = leuchtend
gr = graugrün d = dunkel
fll. = Fluoreszenzlöschung fl.st. = Fluoreszenzsteigerung

---

1) = geringe Konzentration

3. Anthochlorpigmente

Zur näheren Untersuchung der Anthochlorpigmente aus Helichrysum bracteatum wurden die Hüllblätter der gelben Sorte verwendet.

a. Vergleich des Anthochlor C mit natürlichem Bractein

Der chromatographische Vergleich zeigte,daß es sich im Falle von Fleck C auf dem Dünnschichtchromatogramm um das bereits von ALBRECHT (1) erstmalig isolierte Auronglykosid Bractein handelt.Dessen Konstitution konnte inzwischen als die eines 4,6,3',4',5'-Pentahydroxyauron-4-glucosids erkannt werden.(37,38)

b. Identifizierung von Anthochlor B als ein Chalkonglykosid

Das Farbverhalten des Anthochlor B auf dem Dünnschichtchromatogramm im Tages- und UV-Licht,vor und nach dem Alkalisieren,deutete auf das Vorliegen eines Chalkons hin,das chromatographische Verhalten ließ ferner auf ein Glykosid schließen.Jedoch war es nicht möglich, alleine durch einen Vergleich des Gesamtextraktes vor und nach der Hydrolyse diesem Glykosid ein bestimmtes Aglykon zuzuordnen.Da außerdem Vergleichssubstanzen fehlten,wurde die präparative Isolierung der Verbindung notwendig.
Nach Auftrennung des Drogenextrakts an der Perlonsäule in zahlreiche Zonen und Einengen der getrennt aufgefangenen Eluate hatte sich nach längerem Stehen im Eisschrank in der Fraktion 496-562 (siehe Versuchsteil!) ein orangeroter Niederschlag gebildet.Umkristallisieren aus 5o%igem Methanol führte zu orangeroten Plättchen,die bei 18o°C schmolzen.[1] Die chromatographische Prüfung zeigte,daß es sich dabei um das Anthochlor B handelte.Die Verbindung ist durch eine auffallende Instabilität ausgezeichnet.Bereits nach 14-tägigem Stehen einer methanolischen Lösung an der Luft

---

1) Die Schmelzpunktsbestimmung wurde mit einem Heiztischmikroskop der Fa.LEITZ durchgeführt.

konnte dünnschichtchromatographisch keine Ausgangssubstanz mehr nachgewiesen werden.Dafür trat auf dem Dünnschichtchromatogramm eine Vielzahl neuer Flecke auf.
Übersichtshalber seien die Reaktionen und analytischen Daten,die zu einer näheren Charakterisierung der vorliegenden Verbindung sowie deren eindeutigen Identifizierung als ein Chalkonglykosid führten,in folgende Abschnitte unterteilt:

d.Hydrolyse

Wie bekannt ist,sind Chalkone und Flavanone durch Säure- und Alkalibehandlung ineinander überführbar.NARASIMHACHARI und SESHADRI (54) konnten zeigen,daß es bei Anwesenheit einer freien OH-Gruppe in 5-Stellung des Flavanonmoleküls

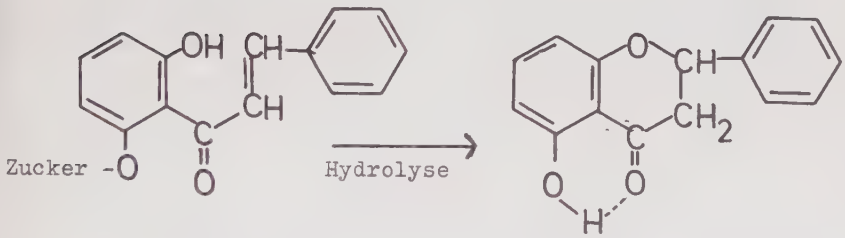


Abb.6

auf Grund von Wasserstoffbrückenbildung zur Stabilisierung des Ringes im Flavanon kommt.In der Tat sind Chalkone mit freien Hydroxylgruppen in 2'- und 6'-Stellung des Moleküls nicht bekannt.Ist jedoch die OH-Gruppe in 5-Stellung des Flavanons glykosidisch mit einem Zucker verknüpft,so kommt es zur Ringöffnung unter Bildung des entsprechenden Chalkonglykosids.Die Hydrolyse dieser Verbindung muß dann zwangsläufig wieder zum Flavanon führen.(Abb.6)
Auch unser Chalkonglykosid B lieferte als aglykonische Komponente ein Flavanon (Tab.6).Damit kann als bewiesen

angesehen werden,daß sich in 2'- und 6'-Stellung des Chalkons eine Hydroxylgruppe befindet,wobei mindestens eine der beiden OH-Gruppen glykosidiert ist.Die RF-Werte und Farbreaktionen des Glykosids sowie dessen Aglykon sind in Tab.6 zusammengestellt.

β.Alkaliabbau

Einen weiteren Hinweis auf die Substitutionsverhältnisse im Chalkonglykosid B erbrachte der Alkaliabbau des Aglykon. Wie das Schema in Abb.7 zeigt,liefern Flavanone je nach den Versuchsbedingungen verschiedene Spaltprodukte (76).

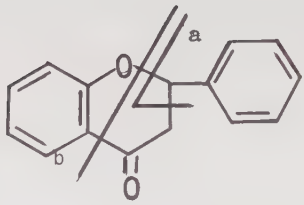


Abb.7

Wird die Aufspaltung bei relativ geringer Alkalikonzentration vorgenommen,so entsteht das entsprechende o-Hydroxyacetophenon- sowie Benzaldehydderivat (a).In stärker alkalischem Milieu wird zunächst ein Phenol sowie die entsprechende Zimtsäure gebildet (b).Beim Erhitzen des stark alkalischen Reaktionsgemischs spalten Flavanone schließlich in ein Phenol- sowie Benzaldehydderivat und Essigsäure. Der erste Schritt bei dieser Abbaureaktion ist die Ringöffnung zum Chalkon.
Die Alkalispaltung unseres cyclisierten Aglykons führte zu Phloroglucin und einem weiteren,bisher noch nicht identifizierten Produkt (siehe Versuchsteil!).Das Auftreten von Phloroglucin beweist,daß Ring A des Chalkons außer in

2'- und 6'-Stellung auch in 4'-Stellung hydroxyliert ist.

γ. UV-Absorptionsmessungen

Gute Dienste bei der Strukturaufklärung flavonoider Verbindungen leisten UV-Absorptionsmessungen (49). Das chromophore System im Chalkon wird von den konjugierten Systemen der Cinnamoyl- und Benzoylgruppe im Molekül gebildet. Die Chalkone sind durch zwei Banden erhöhter Absorption charakterisiert. Sie absorbieren besonders stark im Bereich von 360-400 mμ (Bande I), weniger stark dagegen im Bereich von 220-270 mμ (Bande II). Bande I ist durch ein starkes Absorptionsmaximum bei 340-390 mμ sowie ein kleines Maximum oder eine Inflexion bei 300-320 mμ ausgezeichnet.

Ist das Chalkon hydroxyliert, so beteiligen sich die OH-Gruppen an der Mesomerie. Dies führt zu einer bathochromen Verschiebung des Absorptionsmaximums. Dabei hat, wie das folgende Beispiel zeigt, Substitution im B-Ring einen wesentlich größeren Einfluß als Substitution im A-Ring:

Chalkon	λ_{max} 312 mμ
4'-OH Chalkon	λ_{max} 320 mμ
4-OH "	λ_{max} 350 mμ

Eine isolierte OH-Gruppe in unkonjugierter 3-Stellung beeinträchtigt das Spektrum kaum, während Substitution in 4-Stellung eine besonders starke bathochrome Verschiebung bewirkt. Nach diesen Ausführungen kann angenommen werden, daß im Chalkonglykosid B (λ_{max} 386 mμ) auch der B-Ring, in erster Linie die 4-Stellung, substituiert ist.

Recht aufschlußreich sind die Verschiebungen des Hauptmaximums nach Zugabe von Metallsalzen oder Alkali, da die Spektren durch pH-Änderungen oder Metallsalze unterschiedlich beeinflußt werden. Sind beispielsweise OH-Gruppen, die eine Mesomerie mit der Carbonylgruppe begünstigen, im Molekül vorhanden, so kann es im alkalischen Milieu zu

einer bathochromen Verschiebung des Hauptmaximums kommen. So bewirken bei Anwesenheit von zwei benachbarten Hydroxylgruppen im B-Ring schon Natriumacetat oder Natriummethylat eine auffallende bathochrome Verschiebung. Zugabe von Borsäure zu der natriumacetathaltigen Lösung läßt infolge einer Metallkomplexbildung den bathochromen Effekt kleiner werden, wenn auch immer noch eine deutliche Verschiebung zum Längerwelligen hin bestehen bleibt. Aluminiumchlorid bewirkt, der Meßlösung zugesetzt, sowohl bei Anwesenheit freier benachbarter Hydroxyle als auch einer freien Hydroxylgruppe in Nachbarstellung (2'-bzw. 6'-Stellung) zur Carbonylgruppe eine bathochrome Verschiebung.
Mit beiden Reagenzien (Natriumacetat-Borsäure und $AlCl_3$) konnte im Falle unseres Chalkonglykosids B eine starke bathochrome Verschiebung erzielt werden (Tab.7).
Demzufolge müssen freie benachbarte Hydroxylgruppen im Molekül vorhanden sein. Nach den bisherigen Befunden kommt hierfür nur der B-Ring in Betracht.

	λ_{max} ($\log E_{spec.}$)	$\Delta\lambda$
Methanol p.a.	386mμ (1,57)	-
$AlCl_3$	465mμ (1,71)	79mμ
Na-acetat u. Borsäure	475mμ (1,73)	89mμ
Na-acetat	---instabil---	
Na-methylat	---instabil---	

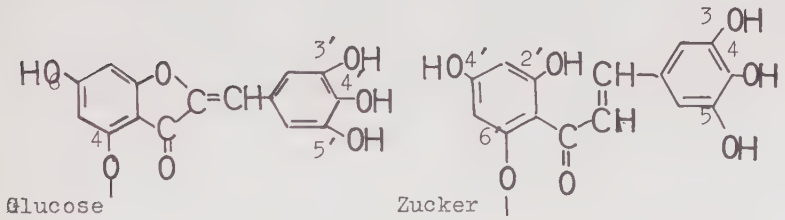
Tab.7

Die ausgesprochene Instabilität unserer Verbindung im alkalischen Milieu (Natriumacetat, Natriummethylat) weist auf einen Vertreter der Polyhydroxychalkone hin, deren Empfindlichkeit gegenüber Alkali aus der Literatur bekannt ist.

8. Tüpfelreaktionen

Eine Hydroxylgruppe in 3-Stellung (des Flavanons) konnte ausgeschlossen werden, da nach PEW (61) die 3-Oxyflavanone mit Zn und HCl zu violettroten Verbindungen reduzierbar sind. Unser Aglykon wurde jedoch nur durch Mg und HCl violettrosa gefärbt.

Auffallend war der Farbwechsel des Aglykons nach Behandeln mit 1n NaOH (BARGELLINItest,2). Die schwach gelbe Farbe schlug binnen Kurzem über grün nach braun um. Dieser Farbwechsel ist bekannt bei Flavanonen mit vicinaler Anordnung der Hydroxyle im Seitenphenyl oder OH-Gruppen in 5-,7- und 8-Stellung des Ringes A. Letzteres konnte auf Grund der bisherigen Ergebnisse ausgeschlossen werden.
Ebenfalls für vicinale OH-Gruppen im Seitenphenyl spricht die blauviolette Färbung nach Besprühen des Papierchromatogramms mit Eisen-III-chlorid (3o).



Bractein

vermutete Strukturformel des Chalkonglykosid B

Abb.8

Auf Grund der vorliegenden Daten sowie biogenetischer Überlegungen scheint es nicht ausgeschlossen, daß es sich bei dem Anthochlor B um das dem Auronglykosid Bractein strukturanaloge 2',4',6',3,4,5-Hexahydroxychalkonglykosid handelt. Die Untersuchungen werden z.Zt. an unserem Institut fortgesetzt.

		Anthochlor B	
		vor Hydrolyse	nach Hydrolyse
RF	a)	-	o,4o
	b)	o,22	o,6o
	c)	o,44	o,67
	d)	-	o,75
RF	e)	o,65	-
	f)	-	o,22
Farbe unbeh.	TL	gelb	farblos
	UV	braun	farblos
	kw.UV	-	dunkel
KOH	TL	orange-rot	gelb→braun→farblos
	UV	tomaten-rot	gelb-braun
$FeCl_3$	TL	dunkel-blau-grau	blau-violett
$NaBH_4$ u. HCl	TL	-	blau-violett

Tab.6 Papier- und dünnschichtchromatographisches Verhalten des Anthochlor B sowie dessen Hydrolyseprodukts

RF-Werte auf Papierchromatogrammen in den Laufmitteln:
a) 3o %ige Essigsäure
b) 6o %ige Essigsäure
c) 5o %igem Isopropanol
d) Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5)
RF-Werte auf Dünnschichtchromatogrammen in den Laufmitteln:
e) Äthylacetat:Äthylmethylketon:Ameisensäure:Wasser(5:3:1:1)
f) Toluol:Äthylmethylketon:Ameisensäure(5:4:1)

c. Identifizierung von Anthochlor A als ein Chalkonglykosid und Nachweis eines weiteren Aurons

Das chromatographische Verhalten (RF-Werte sowie Farbreaktionen nach Alkalisieren) des Anthochlor A legte ebenfalls die Vermutung nahe,daß es sich um ein Chalkonglykosid handeln könnte (Tab.8).Dessen präparative Isolierung mit Hilfe der Chromatographie an Polyamid gelang zwar nicht, jedoch war die Verbindung in der Fraktion 563-600 (siehe Versuchsteil!) stark angereichert.Daher wurde diese Fraktion in dem Gemisch Äthylacetat:Äthylmethylketon:Ameisensäure: Wasser dünnschichtchromatographisch als Streifenchromatogramm entwickelt.Durch Eluieren der dem Fleck A entsprechenden Zone und Einengen des Eluates konnte die Substanz mikropräparativ isoliert werden.

Auch Chalkonglykosid A lieferte nach der Hydrolyse als Aglykon ein Flavanon.Es müssen demzufolge auch hier die 2'- und 6'-Stellung hydroxyliert sein,wobei mindestens eine dieser beiden OH-Gruppen glykosidisch mit einem Zucker verknüpft ist.Nähere Aussagen konnten infolge der zu geringen Substanzmenge nicht gemacht werden.

Neben dem Flavanon trat in dem Hydrolysat des aus dem Dünnschichtchromatogramm eluierten Fleck A noch ein weiteres Aglykon,welches sich auf Grund seiner typischen Farbeigenschaften als Auron zu erkennen gab,in geringer Konzentration auf.Dies verhielt sich hinsichtlich seiner hydrophilen Eigenschaften (Vgl.Kap.A,1,c) sowie seines Farbverhaltens auf dem Dünnschichtchromatogramm wie das Tetrahydroxyauron Aureusidin.Papierchromatographisch konnte deren Identität jedoch ausgeschlossen werden,obwohl es sich um ein dem Aureusidin sehr ähnliches Auron handeln muß. Vor allem spricht die Fluoreszenzlöschung mit Benedikts Reagens für das Vorhandensein einer freien Orthodihydroxygruppierung im Molekül.
Wenn sich das Eluat A auch papierchromatographisch nicht in weitere Flecke auftrennen ließ,so nehmen wir doch an,

		Eluat von Anthochlor A		
		vor Hydrolyse	nach Hydrolyse A_1	A_2
RF	a)	-	o,47	-
	b)	o,4o	o,7o	o,23
	c)	o,51	o,79	o,3o
	d)	-	o,86	o,45
RF	e)	o,78	-	-
	f)	-	o,3o	o,21
Farbe unbeh.	TL	gelb	farblos	gelb
	UV	braun	farblos	gelb
	kw.UV	-	dunkel	-
KOH	TL	orangerot	gelb-braun	orange
	UV	tomaten-rot	gelb-braun	orange
Benedikts Reagens	UV	-	-	Fluores-zenzlö-schung
$FeCl_3$	TL	braun-schwarz	braun-schwarz	braun
$NaBH_4$ u. HCl	TL	-	violett-rosa	-

Tab.8 Papier- und dünnschichtchromatographisches Verhalten des eluierten Anthochlor A sowie der Hydrolyseprodukte

RF-Werte auf Papierchromatogrammen in den Laufmitteln:
a) 3o%ige Essigsäure
b) 6o%ige Essigsäure
c) 5o% igem Isopropanol
d) Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5)
RF-Werte auf Dünnschichtchromatogrammen in den Laufm.:
e) Äthylacetat:Äthylmethylketon:Ameisensäure:Wasser(5:3:1:1)
f) Toluol:Ameisensäureäthylester:Ameisensäure(5:4:1)

daß es sich bei der beschriebenen Substanz um das Aglykon eines weiteren Auronglykosids (A_2),dessen analytischer Nachweis bisher noch nicht erbracht werden konnte,handelt.

4. Flavanone

a. Papierchromatographischer Vergleich der Flavanone mit den cyclisierten Aglyka der Chalkonglykoside A und B

Die Flecke 8 und 9,die lediglich in den Pappushaaren auftreten,gaben sich durch ihr Verhalten vor der Analysenlampe sowie durch Behandeln mit $NaBH_4$ und HCl als Flavanone zu erkennen.Nach Kochen mit HCl blieben beide Flecke unverändert erhalten.Dies führte uns zu der Vermutung,daß es sich um die den Chalkonglykosiden A und B entsprechenden cyclisierten Aglyka handeln könnte.Durch Mitlaufenlassen dieser beiden Aglyka konnte diese Annahme bestätigt werden.

5. Phenylpropankörper

a. Vergleich des Fleck 12 mit Chlorogensäure

	Fleck 12	Chlorogensäure
RF in 15%iger Essigsäure	o,61	o,61
RF in Butanol: Eisessig:Wasser	o,48	o,48
RF in Isopropanol: Wasser (1:4)	o,81	o,81
Farbe unbeh. UV	blau	blau
Farbe NH_3 UV	blau-grün	blau-grün
$FeCl_3$ TL	dunkelgrün	dunkelgrün

Tab.9 Vergleich von Fleck 12 mit authentischer Chlorogensäure

Das Eluat von Fleck 12 konnte als Chlorogensäure erkannt werden.

D. Experimenteller Teil

1. Herkunft des Pflanzenmaterials

Das zur Untersuchung und zum Anbau verwendete Samenmaterial wurde von der Firma BENARY, Hann.-Münden, bezogen. Die einzelnen Sorten führten folgende Bestellnummern und Handelsbezeichnungen:

1) Best.Nr. 1776o Helichrysum monstrosum fl.pleno album
2) " " 17765 " " fl.pleno luteum
3) " " 17763 " " fl.pleno Fireball
4) " " 17764 " bracteatum fl.pleno fuscatum
5) " " 17766 " monstrosum fl.pleno purpureum
6) " " 17767 " bracteatum plenum "Rosa Töne"

2. Aufarbeitungs- und Extraktionsverfahren

Die Ernte erfolgte im Oktober 1961 und 1962. Die Aufarbeitung der entsprechenden Pflanzenteile wurde unmittelbar daraufhin mit je 1o g des getrockneten und zerkleinerten Materials durchgeführt. In allen Fällen wurde zunächst mit Petroläther zur Entfernung lipophiler Substanzen im Soxhlet vorextrahiert. Beim anschließenden Behandeln der Pflanzenteile mit Methanol gingen die phenolischen Inhaltsstoffe in Lösung. Die methanolischen Auszüge wurden im Vakuum zur Trockene eingeengt und der Rückstand mit wenig heißem Wasser aufgenommen und nach zweitägigem Stehen im Eisschrank vom unlöslichen, schmutzigen Rückstand abfiltriert. Dann wurde die wässrige Lösung mit Äther ausgeschüttelt. Die zur Trockene eingeengten Ätherausschüttelungen wurden mit wenig Methanol aufgenommen und zur Chromatographie der Aglyka verwendet. Die wässrige Lösung, evtl. nach Ausschütteln mit Essigester, diente zur Chromatographie der Glykoside. Im Falle der anthocyanführenden Hüllblätter wurde die Droge im Anschluß an die Extraktion mit Methanol nochmals mit 1%iger methanolischer HCl ausgezogen.

3. Tüpfelreaktionen

Reduktionsprobe: o,5 ml der entsprechenden Lösung und eine

Messerspitze Mg-Pulver wurden mit o,5 ml 25%iger HCl versetzt.
$FeCl_3$-Reaktion: o,5 ml der entsprechenden Lösung wurden mit 2 Tropfen einer 1%igen methanolischen $FeCl_3$-Lösung versetzt.
Reaktion mit KOH: o,5 ml der Lösung wurden mit 2 Tropfen 1%iger KOH versetzt.
Reaktion mit H_2SO_4 : o,5 ml der Lösung wurden mit 2 Tropfen konz.Schwefelsäure versetzt.

4. Papierchromatographische Technik

Zur Anfertigung der Papierchromatogramme wurde Papier der Fa.SCHLEICHER u.SCHÜLL Nr.2o43 bM verwendet.Die ein- und zweidimensionalen Chromatogramme wurden in völlig aus Glas bestehenden Entwicklungskammern angefertigt.Es wurde nach der aufsteigenden Methode auf 2o x 2o cm großen Papieren, die zu einem Zylinder geformt waren,chromatographiert.Für die zweidimensionale Chromatographie eignete sich ebenfalls 2o x 2o cm zum Zylinder geformtes Papier.Der Startpunkt lag 2 x 2 cm von einem Ende des Papiers entfernt.Nach dem Entwickeln in der ersten Dimension in der Oberphase des Gemischs Butanol:Eisessig:Wasser (4:1:5) wurde das Papier bei Zimmertemperatur getrocknet,die Flecke im Tages- und UV-Licht notiert.Das um 9o° gedrehte Papier wurde dann in dem System Eisessig:Wasser (15:85) in der zweiten Dimension entwickelt und die Flecke in der oben angegebenen Weise bestimmt.

5. Dünnschichtchromatographische Technik

Zur Chromatographie der synthetisierten Aurone und der Anthochlorpigmente aus Helichrysum bracteatum verwendeten wir gepufferte Kieselgel-G-platten,die nach der Arbeitsvorschrift von E.STAHL (79) hergestellt wurden (3og Kieselgel G in 6o ml Wasser,gepuffert mit 1,5 g Natriumacetat, eine Stunde bei 1o5°C getrocknet).
Als Laufmittel wurden folgende Gemische verwendet:
für Aglyka: (1) Benzol:Essigester:Ameisensäure (4,5:3,5:2), (2) Chloroform:Essigester:Ameisensäure (6:1:1) neben (5:4:1),

(3) Toluol:Ameisensäureäthylester:Ameisensäure (5:4:1), für Glykoside: (4) Äthylacetat:Äthylmethylketon:Ameisensäure:Wasser (5:3:1:1).

Für die Chromatographie der synthetisierten Chalkone verwendeten wir folgendermaßen hergestellte Platten:
15 g Kieselgel G und 15 g Kieselgur G in 6o ml Wasser, eine Stunde bei 1o5°C getrocknet.Chromatographiert wurde in: (5) Cyclohexan:Essigester (7:1),gesättigt mit 5 ml Wasser und 1o ml Formamid.

6. Sprühreagenzien

Als Sprühreagenzien wurden verwendet:

a) KOH,2%ig wässrig
b) $AlCl_3$,1%ig methanol.
c) $ZrOCl_2$,1%ig methanol.
d) $FeCl_3$,2%ig methanol.
e) Naturstoffreagens A (nach NEU),1%ig methanol.
f) Natriumborhydrid: Das Chromatogramm wird zunächst mit einer frisch bereiteten 2%igen alkoholischen Lösung von $NaBH_4$ besprüht.Nach dem Trocknen besprühten wir nochmals mit 5%iger HCl.Im Verlaufe von ca. 5 bis 1o Minuten gaben sich die Flavanone durch rotviolette Färbung zu erkennen.
g) Benedikts Reagens: Die Herstellung erfolgte folgendermaßen: 173 g Natriumcitrat und 117 g Natriumcarbonat wurden in der Hitze in etwa 7oo ml Wasser gelöst und filtriert.Kupfer-II-sulfat (17,3g) wurde in 1oo ml Wasser gelöst und diese Lösung unter Rühren langsam in die erste gegossen.Nach dem Abkühlen füllten wir bis zu einem Gesamtvolumen von einem Liter auf.
h) Echtschwarzsalz K (diazotiertes-4-amino-3,6-dimethoxy-4'-nitro-azobenzol),1%ig methanol.
i) Diazotiertes p-Nitranilin nach BRAY und Mitarb.(3o) Herstellung: 25 ml o,3%ige p-Nitranilinlösung in 8%iger HCl werden mit 1,5 ml 5%iger $NaNO_2$-Lösung unmittelbar vor dem Benutzen vermischt.Anschließend wird das Chromatogramm noch mit 2o%iger Na_2CO_3-Lösung besprüht.

7. Elution aus dem Papierchromatogramm

Die mikropräparative Trennung der Gemische erfolgte auf Bandchromatogrammen,die durch Auftragen eines ununterbrochenen Streifen entlang der Startlinie des Papiers und nachfolgender Chromatographie in der üblichen Weise erhalten wurden.Nach dem Entwickeln wurde das gewünschte, durch Trennung erhaltene Band ausgeschnitten,zwischen zwei Objektträger mit einem Ende eingespannt,in eine erhöht aufgestellte Photoschale mit 5o%igem Methanol als Elutionsmittel eingelegt und mit dem freien Ende in eine Porzellanschale eingehängt.In einer dicht schließenden Glaskammer wurde die Substanz so innerhalb von 24 Stunden vollständig eluiert.

8. Elution aus dem Dünnschichtchromatogramm

Das Gemisch wurde in Form eines ununterbrochenen Streifens entlang der Startlinie des Dünnschichtchromatogramms aufgetragen.Nach Entwickeln des Chromatogramms wurde die gewünschte Zone mit Hilfe eines Objektträgers von der Glasplatte entfernt und mit Methanol gut durchgeschüttelt. Nach Abfiltrieren der Lösung vom Kieselgel und Einengen des Filtrats im Vakuum konnte das so erhaltene Eluat direkt weiterverarbeitet werden.

9. Alkalispaltung

Die Substanz (etwa 2mg) wurde in einem kleinen Spitzkölbchen mit aufgesetztem Kühler auf dem Sandbad in 1 ml 5o%iger KOH 2o Minuten lang gekocht.Die erst tiefblauviolette Farbe der Lösung hatte sich nach dieser Zeit braun verfärbt.Die abgekühlte Lösung wurde mit 2n H_2SO_4 angesäuert und mehrmals mit je 5 ml Äther ausgeschüttelt.Der Äther wurde mit Wasser neutral gewaschen,mit Natrium sulfuricum sicc.getrocknet und abdestilliert.
Der Rückstand wurde mit Methanol aufgenommen und papierchromatographisch geprüft.Wie Tab.1o zeigt,konnte eines der Spaltprodukte als Phloroglucin identifiziert werden.

		Spaltprodukte		Phloroglucin
		RF_1	RF_2	
RF	a.	o,31	o,48	o,48
	b.	o,64	o,16	o,16
Farbe	TL	-	-	-
	UV	-	-	-
	UV-kw.	blau-grün	hell-blau	hell-blau
NH_3	UV	blau-grün	hell-blau	hell-blau
Echt-schwarzsalz K	TL	violett-blau	dunkel-blau	dunkel-blau
diaz. p-Nitr.	TL	hell-braun	braun	braun

Tab.1o a. = 2%ige Essigsäure
b. = m-Kresol:Essigsäure:Wasser (48:2:5o)

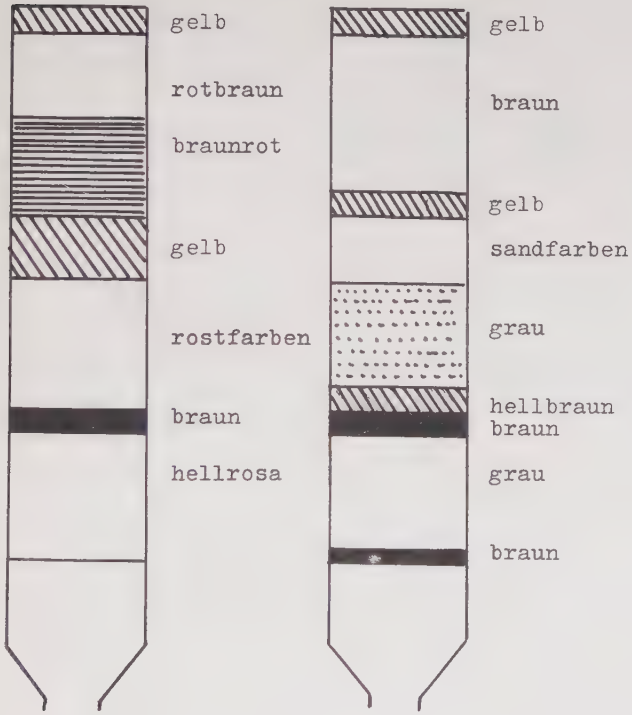
1o. Säurehydrolyse

Die salzsaure Lösung der zu hydrolysierenden Substanz oder des Substanzgemischs wurde unter Zusatz von etwas Methanol auf dem Luftbad unter Rückfluß gekocht (Dauer und HCl-Konzentration sind jeweils in den einzelnen Fällen genannt). Nach Abdunsten des Methanols wurde die wässrige Phase mehrmals mit Äther ausgeschüttelt (im Falle der Anthocyanidine mit Amylalkohol),die vereinigten Äther- (bzw.Amylalkohol-) ausschüttelungen mit Wasser neutral gewaschen, mit Natrium sulfuricum siccum getrocknet und der Äther

abgedunstet.Der Rückstand wurde mit wenig Methanol aufgenommen und zur Chromatographie oder entsprechenden Weiterverarbeitung verwendet.

11. Säulenchromatographie an Perlonpulver

Eine Säule von 6 cm Ø und 25 cm Höhe wurde mit dem Versuchsprodukt PP 15 Sp der BASF gefüllt und das Pulver mit dest.Wasser und anschließend mit reinem Methanol ge-



Zonen im Tageslicht Zonen im UV-Licht

Abb.9

waschen.Durch eine 2 cm starke Schicht von Seesand wurde das Aufwirbeln des Perlonpulvers verhindert.Auf die Säule

wurde dann der wässrige,filtrierte Pflanzenextrakt gegeben. Das Verhältnis von eingeengter Substanz zu Perlon betrug etwa 1:1oo.Nach dem Einsickern wurde zunächst mit dest. Wasser eluiert.Nach 3o Stunden hatten sich auf der Säule die in Abb.9 dargestellten Zonen ausgebildet.Von nun an wurde mit Methanol steigender Konzentration eluiert.Die einzelnen Eluate wurden mit Hilfe eines Fraktomatgeräts reagenzglasweise gesammelt und die Trennung chromatographisch verfolgt.Identische Fraktionen wurden vereinigt und im Vakuum auf ein kleines Volumen eingeengt.Aus den vereinigten Eluaten 496-562 war nach zweiwöchigem Stehen im Eisschrank Anthochlor B ausgefallen.In der Fraktion 563-6oo war Anthochlor A neben Anthochlor C stark angereichert.Diese Fraktion fand deshalb zur mikropräparativen Isolierung von Anthochlor A Verwendung.

12. UV-Absorptionsmessungen

Die Messungen wurden mit einem Spektralphotometer der Fa. Carl Zeiss PM Q II durchgeführt.Es wurden Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet.Bei der graphischen Auswertung der Ergebnisse wurde log $E_{spec.}(cm^2mg^{-1})$ gegen die Wellenlänge ($m\mu$) aufgetragen.Die Konzentration des Chalkonglykosids B in reinem Methanol bzw. den anderen Meßlösungen betrug je nach dem Meßbereich $1o^{-2}$ oder $2x1o^{-2}$ g/l.Die Messungen wurden in folgenden Lösungen vorgenommen:
Aluminiumchlorid (o,5%ig) in Methanol
Natriumacetat (o,5%ig) - Borsäure (1%ig) in Methanol
Natriumacetat (wasserfrei,gesättigt) in Methanol
Natriummethylat (o,oo2m) in Methanol
In Natriumacetat und Natriummethylat war der genaue Kurvenverlauf nicht zu ermitteln,da schon während der Messung eine Zersetzung der Substanz eintrat.
Die Messergebnisse in Methanol p.a.,Natriumacetat-Borsäure und Aluminiumchlorid zeigt die Kurve in Abb.1o.

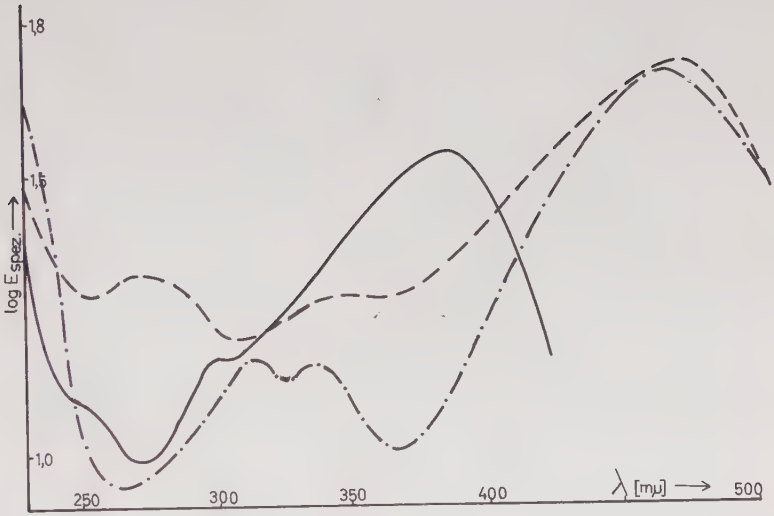


Abb.1o UV-Absorptionskurven von Anthochlor B in:

_____ = Methanol p.a.

_ _ _ _ _ _ _ = Natriumacetat-Borsäure

-.-.-.-.-.-.- = $AlCl_3$

E. Diskussion der Ergebnisse

Wie die vorliegenden Untersuchungen zeigen (siehe auch Tab.13!),wird die Mannigfaltigkeit in der Färbung der Hüllblätter der verschiedenen Sorten von Helichrysum bracteatum im Wesentlichen durch das Zusammenwirken folgender Pigmente bestimmt:

1.Anthocyan (mit einem Cyanidinglykosid)
2.Anthochlore (mit dem Auronglykosid Bractein und den beiden Chalkonglykosiden A und B)
3.Flavone (mit Luteolin-7-glucosid,Orientin und Homo-Orientin als Hauptflavonen sowie Quercetin und einem Apigeninglykosid als Nebenflavonen)

Variationsmöglichkeiten sind nicht nur auf Grund der Anwesenheit oder des Fehlens dieser einzelnen Komponenten, sondern darüberhinaus durch deren spezielle Mengen- und Mischungsverhältnisse gegeben.Unsere in Tab.11 zusammengefaßten Untersuchungsergebnisse finden ihre Bestätigung in den bereits aus der Literatur bekannten Anschauungen über das Zustandekommen der Blütenfarben:

Farbe der Hüllblätter	Flavon	Anthochlor	Anthocyan
weiß	wenig	fehlt	fehlt
gelb	viel	sehr viel	fehlt
orangerot braun	viel viel	sehr viel viel	viel sehr viel
violett rosa	viel sehr viel	fehlt fehlt	sehr viel viel

Tab.11 Farbskala und Pigmentation der Hüllblätter von Helichrysum bracteatum

Wie der Tab.11 zu entnehmen ist,handelt es sich bei den Hüllblättern der weißen Sorte um keine reine Albinoform. Bereits ROLLER (66) konnte an Hand eingehender papier-

chromatographischer Untersuchungen einer Reihe charakteristischer weißer Petalen zeigen,daß weiße Blumenblätter fast immer Flavone und (oder) Flavonole enthalten.Flavonlose Albinoformen,wie sie in Antirrhinum majus vorliegen,müssen demzufolge als Ausnahme gelten. Auch REZNIK (63) weist darauf hin,daß die in vielen Lehrbüchern enthaltenen Angaben über die Pigmentlosigkeit weißer Petalen unrichtig sind.

Die Gelbfärbung der Hüllblätter beruht im vorliegenden Fall auf der Anwesenheit der koloristisch so wirksamen Aurone und Chalkone.Dies ist insofern bemerkenswert,als unstreitig die Mehrzahl gelber Petalen plasmochrom gelb gefärbt ist (Carotinoide),wenn auch Anthochlore in Compositen schon mehrfach nachgewiesen wurden (21).
Die Violett- und Rosafärbung der Hüllblätter ist auf die Gegenwart eines in unterschiedlichen Mengen vorhandenen Cyanidinglykosids zurückzuführen.Nach Angaben der Literatur (75) werden rote bis blaue Farbtöne ausschließlich durch Anthocyane bedingt.Daß den Cyanidinglykosiden besonders violette Blumenblätter ihre Färbung verdanken,wurde bereits von REZNIK (63) ausgesprochen.

Orangerote Farbnuancen entstehen in der Regel durch das Zusammenwirken von Anthocyanen mit einer gelben Komponente.Letztere wird nicht selten,wie im Falle der orangeroten und braunen Hüllblätter von Helichrysum bracteatum,durch Aurone und Chalkone repräsentiert.

In allen genannten Fällen wirken Flavone und Flavonole als Copigmente modifizierend.

Die auffallende Variabilität in der Flavonoidausgestaltung in Helichrysum bracteatum betrifft nun,wie aus Tab.13 ersichtlich ist,in erster Linie die Hüllblätter.Bereits in den Pappushaaren fehlen Anthocyane gänzlich,während bezüglich der Verteilung der übrigen Flavonoide annähernd

Übereinstimmung mit den Hüllblättern herrscht.Lediglich in den Pappushaaren der weißen Sorte konnten keinerlei phenolische Inhaltsstoffe nachgewiesen werden.Das Fehlen jeglicher phenolischer Verbindungen ist auch ein durchgängiges Merkmal der Blütenkronen.Die stets gleichbleibende Gelbfärbung wird hier durch die Anwesenheit eines petrolätherlöslichen Farbstoffs bisher noch unbekannter Konstitution bedingt.Ähnliche Verhältnisse scheinen in Dahlia variabilis vorzuliegen[1].

In den Wurzeln und Früchten aller von uns untersuchten Sorten sind übereinstimmend drei Phenylpropankörper vom Typ der Zimtsäure oder Oxycumarine (u.a.Chlorogensäure) als alleinige phenolische Bestandteile vertreten,während in den Laubblättern zusätzlich Flavone nachgewiesen werden konnten.Untersuchungen mehrerer Autoren über die Verteilung der Inhaltsstoffe innerhalb der gleichen Pflanze führten zu ähnlichen Ergebnissen.So weist bereits BATE-SMITH (4) darauf hin,daß Flavonole,Kaffeesäure,p-Cumarsäure,Ferulasäure und Sinapinsäure die häufigsten phenolischen Bestandteile der Blätter sind,während C-9-Körper in den Petalen nicht oder kaum in nennenswerten Mengen vorkommen.REZNIK (63) empfiehlt bei Laubblattanalysen immer auf das Vorkommen zweier fast nie fehlender Copigmente,die zu den Flavonen mit 3',4'-Hydroxylen im B-Ring in auffallender Beziehung stehen,der Kaffeesäure und deren Depsid,der Chlorogensäure,zu achten.

Die dargelegten Unterschiede in der Pigmentausgestaltung der verschiedenen Gewebeteile einer Pflanze bestätigen die Aussage von SWAIN und BATE-SMITH (82):"...that each cell fabricates its own pattern of phenolic substances from relatively simple common precursors present within it or translocated to it from other organs in the plant."

---

1) "The petal tube and the lower part of the petal were not included in the examination,since in normal flowers these invariably contain yellow pigment."(4)

Bezüglich der Verteilung der in Helichrysum bracteatum vorkommenden Pigmente auf die einzelnen Pflanzenteile der unterschiedlichen Farbsorten kommen wir auf Grund der geschilderten Untersuchungsergebnisse zu folgender Aussage: Der gegenüber den vegetativen Teilen der Pflanzen gesteigerten Mannigfaltigkeit in der Färbung der Hüllblätter entspricht auch eine größere Mannigfaltigkeit der beteiligten flavonoiden Verbindungen.Diese gleichen sich im Bau des Ringes A,der in allen Fällen das Hydroxylierungsmuster des Phloroglucins aufweist.Variabilität herrscht hingegen in der Ausgestaltung des heterocyclischen Ringes,der bestimmt zu welcher Gruppe der Flavonoide (Flavone,Flavonole,Flavanone,Anthocyanidine, Aurone,Chalkone) die betreffende Verbindung gehört,sowie in der Zahl der im B-Ring befindlichen Hydroxylgruppen (4'-OH im Apigenin,3',4'-OH im Luteolin,Quercetin und Cyanidin, 3',4',5'-OH im Bractein und wahrscheinlich im Chalkonglykosid B).

Wie die folgenden Ausführungen zeigen,stehen unsere Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit den an Hand biochemischer und genetischer Untersuchungen erarbeiteten Vorstellungen über die Biosynthese der C-9- und C-15-Körper sowie deren biogenetische Verknüpfung.Sie können darüberhinaus als weitere Stütze für die Richtigkeit dieser Vorstellungen dienen.

Insbesondere durch den Einsatz isotopenmarkierter Verbin-

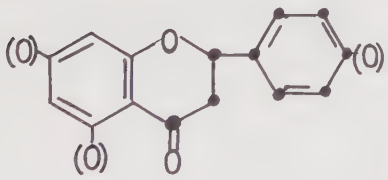


Abb.11 nach GRISEBACH

dungen konnten in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte

bei der Aufklärung der Biosynthese der Flavonoide erzielt werden (29).So hat die "Bausteinanalyse" ergeben,daß der Ring A der Flavonoide durch "Kopf-Schwanz"-Verknüpfung dreier Acetateinheiten (via Malonyl-Co-A) gebildet wird, während der B-Ring und die C-Atome 2,3 und 4 aus einer Phenylpropaneinheit (wahrscheinlich p-Cumarsäure oder Kaffeesäure) stammen.Ein wesentlicher Schritt bei der Biosynthese der Flavonoide wäre dann die Kondensation der C-6-C-3-Vorstufe mit den drei für die Bildung des Ringes A notwendigen Acetateinheiten.Nach GRISEBACH (29) muß auf diese Weise eine ß-Polyketosäure entstehen,die dann einen intramolekularen Ringschluß erleidet,wobei als erste stabile Verbindung ein Chalkon entstehen sollte.Von hier aus kann es dann zur Bildung der verschiedenen Flavonoide kommen durch Ringschluß der C-3-Kette zum Heterocyclus und entsprechende Abwandlung des Oxydationszustandes des γ-Pyronringes sowie des B-Ringes.

Die einzelnen Syntheseschritte stehen nun,wie wir wissen, unter der Kontrolle von Genen.Auf Grund zahlreicher genetischer und biochemischer Untersuchungen sind wir heute in der Lage,die Wirkung einer großen Zahl von Blütenfarbgenen zu kennen,die die Bildung bestimmter Pigmente sowie die Abwandlung deren Molekülstrukturen regulieren.

Durch den Ausfall eines einzigen Gens kann bereits die Synthese jeglicher Flavonoide unterbunden werden.So war bei einer Antirrhinummutante mit flavonlosen weißen Blüten durch Ausfall des Gen "N" die Zusammenfügung zur C-6-C-3-C-6-Kette unterdrückt.Dafür konnte jedoch eine Anhäufung der vorangehenden Phenylpropanvorstufen,Ester der p-Cumar- und der Kaffeesäure,nachgewiesen werden (22,68).

Für engere Beziehungen zwischen Phenylpropanen und Flavonoiden sprechen nun ebenfalls unsere Ergebnisse.Auch in Helichrysum bracteatum wird die auffallend niedrige Konzentration der Flavone und das völlige Fehlen weiterer flavonoider Verbindungen in den weißen Hüllblättern durch das Auftreten dreier Phenylpropane (u.a.Chlorogensäure)

kompensiert.Hier scheint es nun u.a. die Chlorogensäure zu sein,die eine besondere Depotform der für die Synthese der Flavonoide nicht verbrauchten Kaffeesäure darstellt; denn auch in unserem Fall konnten in den gefärbten Hüllblättern die entsprechenden Flavonoide Luteolin,Quercetin und Cyanidin,nachgewiesen werden,während die genannten C-9-Körper hier nicht auftreten.

Engere biogenetische Beziehungen sollen nach Angaben der Literatur (39) zwischen den Flavonen,Flavonolen und Anthocyanen bestehen.An Hand genetischer Untersuchungen konnte festgestellt werden,daß bestimmte Gene oft die Einführung einer bestimmten Zahl von Hydroxylen in den B-Ring aller drei genannten Flavonoidtypen bestimmen,und es wird vermutet,daß diese Gene in einer frühen Stufe der Biosynthese die Modifizierung einer für alle drei Pigmente gemeinsamen Vorstufe bewirken.Damit würde das häufige Nebeneinanderauftreten von Flavonen,Flavonolen und Anthocyanidinen mit gleichem Hydroxylierungsmuster im B-Ring eine Erklärung finden.Auch in Helichrysum bracteatum gleichen sich das Luteolin,Quercetin und Cyanidin in der Art der Substitution im B-Ring.Eine Ausnahme bildet nur das in auffallend niedriger Konzentration vorhandene Apigenin.Doch weist schon HARBORNE (39) darauf hin,daß die genetische Kontrolle über den Oxydationszustand des B-Ringes selten vollständig ist,so daß neben den höher hydroxylierten Flavonoiden auch noch die entsprechend niederhydroxylierten Verbindungen als Begleitstoffe auftreten können.
Zur Ausbildung der in 3-Stellung hydroxylierten Flavonoide (Anthocyane und Flavonole) ist gegenüber der Flavonbildung ein weiterer Syntheseschritt zur Einführung einer OH-Gruppe in den heterocyclischen Ring nötig.So wird die Anthocyanbildung oft durch den Ausfall von Genen,die die Flavonbildung nicht beeinflussen,unterdrückt.In Antirrhinum majus steht z.B. die Bildung der in 3-Stellung hydroxylierten Flavonole und Anthocyane unter der Kontrolle des Gen P.

Die pp-Genotypen enthalten nur Flavone und Flavanone.Für einen relativ einfachen Biosyntheseweg der Flavone spricht nun auch deren Vorkommen in allen untersuchten Sorten von Helichrysum bracteatum,während Anthocyan und Flavonol nur in einigen Fällen zusätzlich auftreten.
Untersuchungen von GEISSMAN (23) über die Chalkon- und Auronbildung in Antirrhinum majus und in Coreopsisarten zeigen, daß der Syntheseweg,der zu diesen Pigmenten führt,bereits auf einem frühen Stadium der allgemeinen Synthese von dem zu den übrigen Flavonoiden führenden Hauptweg abzweigen muß. So beeinflußt das Hydroxylierungsgen "M" nicht die Auronbildung.Aureusidin (3',4'-OH-Gruppierung im B-Ring) konnte in allen Genotypen,unabhängig von der Ausgestaltung des B-Ringes der anderen Flavonoide,nachgewiesen werden.
Auch in Helichrysum bracteatum stellen die im B-Ring dreifach hydroxylierten Anthochlore (Bractein und wahrscheinlich Chalkonglykosid B) gerade die Hauptpigmente der entsprechend gefärbten Hüllblätter dar,während die derartig substituierten Flavone,Flavonole oder Anthocyane nicht nachgewiesen werden konnten.Das ständige gekoppelte Auftreten der Aurone und Chalkone läßt auf engere biogenetische Beziehungen dieser Pigmente untereinander schließen.

Zu welcher Aussage gelangen wir auf Grund der vorliegenden Untersuchungen hinsichtlich des taxonomischen Werts bestimmter Molekülstrukturen der Flavonoide?
1.Offensichtlich neigt die Ausgestaltung des heterocyclischen Anteils der Flavonoide bereits innerhalb der Art zu starker Variabilität und stellt somit für Fragen der Taxonomie kein wesentliches Merkmal dar.
2.Bezüglich des Hydroxylierungsmusters im B-Ring bleibt zwar innerhalb der Art die Tendenz zur Ausbildung von Di- und Tri-hydroxyderivaten gewahrt,jedoch zeigt ein Vergleich mit den aus Helichrysum arenarium bekannten Flavonoiden (Tab.12),daß dieses Prinzip schon innerhalb der Gattung durchbrochen wird.Hier finden wir ausschließlich die ein-

fachen,in 4'-Stellung hydroxylierten Flavonoide.Auch aus der Literatur sind Beispiele dafür bekannt,wie wechselnd die Hydroxylierung von Art zu Art der gleichen Gattung sein kann.So führt Erythrophleum africanum Myricetin und (+)-Dihydromyricetin,während die zur gleichen Gattung gehörende Erythrophleum guineense die wenig hydroxylierten Flavone Luteolin und Apigenin enthält (36).
Die Ausgestaltung des B-Ringes der Flavonoide scheint demnach u.U. zwar zur Abgrenzung von Arten geeignet zu sein, kann jedoch nicht als ein charakteristisches Merkmal im Sinne der Taxonomie zur Umgrenzung höherer taxonomischer Einheiten gewertet werden.
Die auffallende Variabilität in der Flavonoidzusammensetzung in den Hüllblättern lehrt,daß die buntgefärbten Schauorgane der floralen Region für vergleichende Untersuchungen denkbar ungeeignet sind.Schon BATE-SMITH (3,4) weist darauf hin,daß die Bestandteile der Laubblätter typischer für die Pflanze und daher zur Beantwortung von Fragen der vergleichenden Physiologie und der Taxonomie geeigneter sind als diejenigen Inhaltsstoffe abgestorbener oder reproduktiver Organe.Betrachten wir unter diesem Gesichtspunkt die Flavonoide der Laubblätter von Helichrysum bracteatum, so stellen wir fest,daß -soweit überhaupt vorhanden- die gleichen Flavonoide in allen untersuchten Sorten auftreten. Doch nicht das Vorkommen dieser Luteolinderivate als solcher scheint uns bemerkenswert,sondern die besondere Art der Speicherung in Form eines außergewöhnlich wasserlöslichen Glykosids des Homo-Orientins;denn nach HÄNSEL (33) wird durch die Endausgestaltung der sekundären Stoffwechselprodukte die Exkretion von der Pflanze in ganz bestimmte Bahnen gelenkt,indem die Exkrete einmal wasserlöslich gemacht und in die Vakuolen ausgeschieden werden,oder indem sie in lipophiler Form in anatomisch differenzierten Exkreträumen gespeichert werden.Das Auftreten und die nähere Ausgestaltung des Exkretionssystems sollen aber ein wesentliches

Stoffklasse	Zahl und Stellung der OH-Gruppen im B-Ring	H.bracteatum	H.arenarium
Aurone	3',4',5'-OH	Bractein	-
Chalkone	4-OH	-	Isosalipurposid
	3,4-OH	Chalkonglykosid A[1)]	-
	3,4,5-OH	Chalkonglykosid B[2)]	-
Flavanone	4'-OH	-	Naringenin-5-glucosid
	3',4'-OH	Flavanon A[1)]	-
	3',4',5'-OH	Flavanon B[2)]	-
Flavone	4'-OH	Apigenin (als Glykosid)	Apigenin-7-glucosid
	3',4'-OH	Luteolin, Luteolin-7-glucosid, Orientin, Homo-Orientin, Homo-Orientinglykosid	-
Anthocyane	3',4'-OH	Cyanidin (als Glykosid)	-

Tab.12 Vergleich der bisher bekannten flavonoiden Verbindungen aus Helichrysum bracteatum und Helichrysum arenarium

---

1,2) Der endgültige Konstitutionsbeweis konnte noch nicht erbracht werden. Die bisher vorliegenden Untersuchungen sprechen jedoch für [1)] Di- bzw. [2)] Trihydroxygruppierungen im B-Ring. Die Untersuchungen werden z.Zt. an unserem Institut fortgesetzt (siehe auch: Dissertation RIMPLER (65) in Vorbereitung!).

Merkmal im Sinne der Taxonomie darstellen.Nach dem Gesagten könnte man in dem Homo-Orientin-glykosid einen Indikator für eine besondere Stoffwechseleigentümlichkeit der Pflanze,die Fähigkeit,die sekundären Stoffwechselprodukte in bestimmter Form zu speichern,sehen.Ob diesem Merkmal jedoch ein taxonomischer Wert innerhalb des Verwandtschaftskreises zukommt,kann selbverständlich an Hand der vorliegenden Untersuchungen noch nicht entschieden werden.Gezieltere Untersuchungen auf breiterer Grundlage würden hierüber erst Aussagen zulassen.

Erklärung zu Tabelle 13

A = Chalkonglykosid A
B = Chalkonglykosid B
C = Auronglykosid C (Bractein)

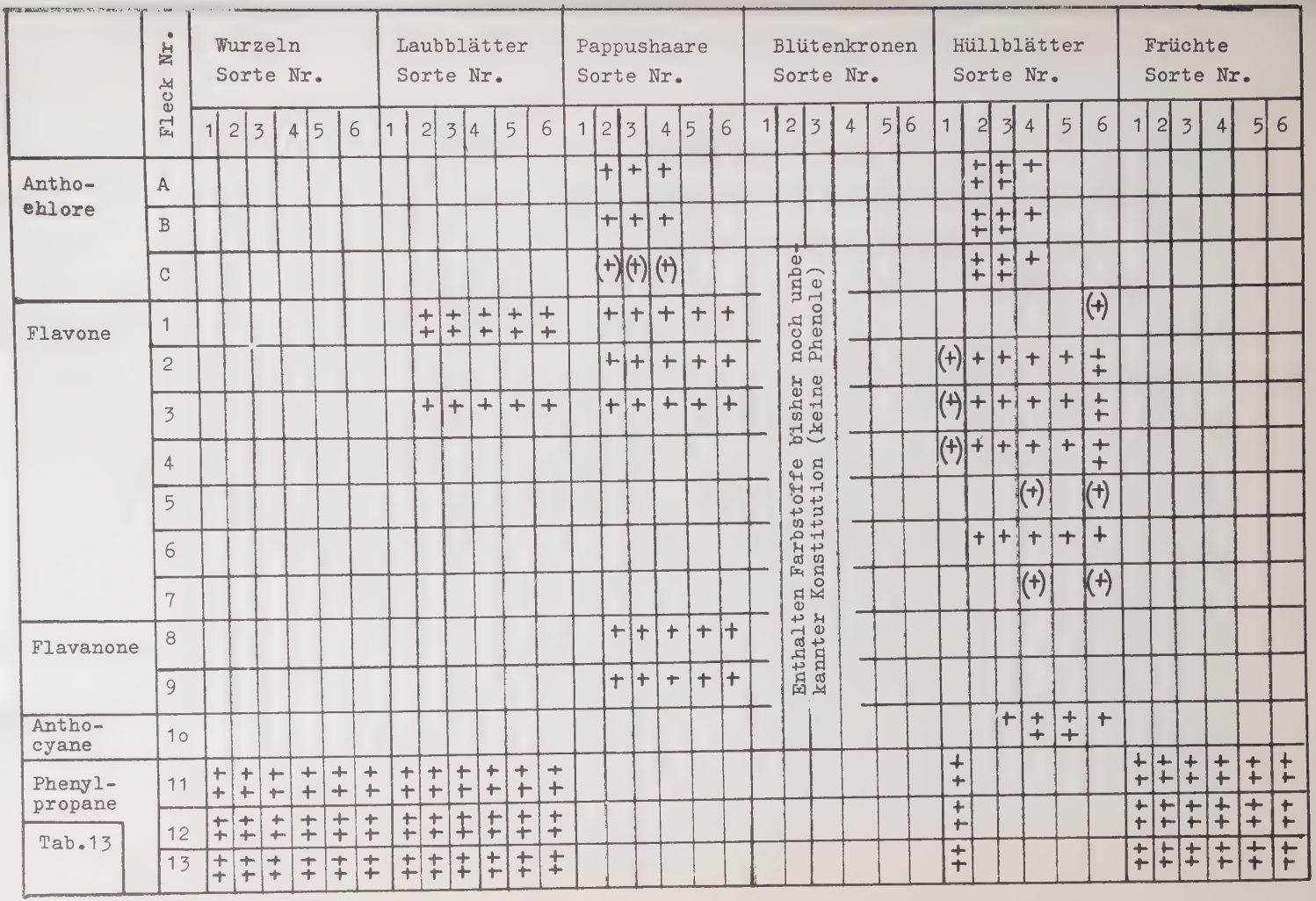
1 = ein Glykosid des Homo-Orientin
2 = Homo-Orientin
3 = Orientin
4 = Luteolin-7-glucosid
5 = ein Apigeninglykosid
6 = Luteolin
7 = Quercetin

8 = Flavanon A
9 = Flavanon B

1o = ein Cyanidinglykosid

11 = Pflanzensäure oder Cumarin
12 = Chlorogensäure
13 = Pflanzensäure oder Cumarin

(+) = wenig
\+ = viel
‡ = sehr viel
□ = nicht vorhanden


Fleck Nr.
Wurzeln Sorte Nr.
Laubblätter Sorte Nr.
Pappushaare Sorte Nr.
Blütenkronen Sorte Nr.
Hüllblätter Sorte Nr.
Früchte Sorte Nr.
1 2 3 4 5 6
Antho-chlore
A
B
C
Flavone
1
2
3
4
5
6
7
Flavanone
8
9
Antho-cyane
1o
Phenyl-propane
11
12
13
Enthalten Farbstoffe bisher noch unbekannter Konstitution (keine Phenole)

Tab.13

Zusammenfassung

Die Verteilung der C-15- und C-9-Körper auf mehrere Pflanzenteile von sechs Farbsorten von Helichrysum bracteatum (Vent.)Willd. wird papier- und dünnschichtchromatographisch geprüft.

Bereits bekannt als Bestandteile der Hüllblätter der gelben Sorte waren:Luteolin-7-glucosid und Bractein.

Erstmalig in Helichrysum bracteatum nachgewiesen und identifiziert werden konnten:Luteolin,Orientin,Homo-Orientin,ein Homo-Orientinglykosid,ein Apigeninglykosid, Quercetin,ein Cyanidinglykosid und Chlorogensäure.

Erstmalig in Helichrysum bracteatum nachgewiesen wurden ferner:Zwei Phenylpropankörper bisher noch nicht identifizierter Konstitution,zwei Chalkonglykoside(A und B) sowie deren cyclisierte Aglyka (Flavanon A und B).

Chalkonglykosid B konnte isoliert und näher charakterisiert werden.Es handelt sich wahrscheinlich um das dem Auronglykosid Bractein strukturanaloge Chalkonglykosid (2',4',6',3,4,5-Hexahydroxychalkonglykosid).

2o synthetisierte Aurone und Chalkone konnten dünnschichtchromatographisch (modifiziert nach einer Methode von STAHL zur Trennung mehrerer α- und γ-Pyronderivate) getrennt werden.Dabei wurden Gesetzmäßigkeiten beobachtet, die es gestatten,aus der Höhe des RF-Werts Rückschlüsse auf die Konstitution eines unbekannten Auron- oder Chalkonderivates zu ziehen.

An Hand der vorliegenden Ergebnisse werden biogenetische Zusammenhänge und der taxonomische Wert bestimmter Strukturmerkmale der Flavonoide diskutiert.

Literaturverzeichnis

1.ALBRECHT,A.G.	Dissertation,Berlin 1962
2.BARGELLINI,G.	zit.bei ZECHMEISTER:"Fortschritte der Chemie org.Naturstoffe",Bd.XVII,S:12
3.BATE-SMITH,E.C.	Biochem.Soc.Symposium 3,68(1951)
4.BATE-SMITH,E.C.,NORD-STRÖM,C.G.u.SWAIN,T.	Nature 176,1o16(1955)
5.BATE-SMITH,E.C.u. WESTALL,R.G.	Biochimica et Biophysica Acta 4,417-4o (195o)
6.BEALE,G.H.u.PRICE,J.R.	J.Genet.41,65(194o)
7.BENTHAM,G.	Flora Australiensis III,London 1866
8.BENTHAM,G.u.HOOKER,J.	Genera Plantarum II,London 1877
9.BIRCH,A.G.	in GEISSMAN,T.A.:"The Chemistry of Flavonoid Compounds",Seite:18-26
1o.BRIGGS,L.H.u.LOCKER,R.	J.Chem.Soc.(Lond.) 1951,3136
11.DIELS,L.	Die Pflanzenwelt von Westaustralien Leipzig 19o6
12.DIELS,L.u.MATTICK,F.	Pflanzengeographie,Göschen 389/389a Berlin 1958
13.DIELS,L.u.PRITZEL,E.	Fragmenta Phytographiae Australiae occidentalis,Leipzig 19o5
14.EGGER,K.u.REZNIK,H.	Planta 57,239-249(1961)
15.ENDRES,H.u.HÖRMANN,H.	Angew.Chemie 75,288-94(1963)
16.ENGLER+PRANTL	Natürliche Pflanzenfamilien IV.Leipzig 1897
17.FEENSTRA,W.J.	in PRIDHAM,J.B.:"Phenolics in Plants in Health and Disease",Pergamon-Press 196o
18.FEENSTRA,W.J.	Planta Medica 1o,412-19(1962)
19.GAGE,T.B.,DOUGLASS,C.D. u.WENDER,S.H.	Analyt.Chem.23,1583(1951)
2o.GEISSMAN,T.A.	in PAECH-TRACY:"Moderne Methoden der Pflanzenanalysen" III ,1955
21.GEISSMAN,T.A.	The Chemistry of Flavonoid Compounds, Pergamon Press 1962

22.GEISSMAN,T.A.u. HARBORNE,J.B. Arch.Biochem.Biophys.55,447(1955)

23.GEISSMAN,T.A.,HARBORNE, J.B.u.SEIKEL,M.K. J.Amer.Chem.Soc.78,825(1956)

24.GEISSMAN,T.A.u.HINREINER,E. Bot.Review 18,77-244(1952)

25.GEISSMAN,T.A.,JORGENSON, E.C.u.JOHNSON,B.L. Arch.Biochem.Biophys.48,368(1954)

26.GRASSMANN,W.,ENDRES,H., OPPELT,M!u.HASSAN EL SISSI Das Leder X,149 (1959)

27.GRASSMANN,W.,HÖRMANN,H. u.HARTL,A. Makromolekulare Chem.XXI,37(1956)

28.GRIFFITHS,L. Biochem.J.7o,12o(1958)

29.GRISEBACH,H. Plante Medica 1o,361-84(1962)

3o.HAIS,I.M.u.MACEK,K. Handbuch der Papierchromatographie Fischer Jena 1958

31.HÄNSEL,R. Arch.Pharmaz.289,619-28(1956)

32.Hänsel,R. in LINSKENS,H.F.:"Papierchromatographie in der Botanik",1959

33.HÄNSEL,R. Planta Medica 1o,361-84(1962)

34.HÄNSEL,R.u.HÖRHAMMER,L. Arch.Pharmaz.287,117-26(1953)

35.HÄNSEL,R.u.HÖRHAMMER,L. Arch.Pharmaz.287,189 (1954)

36.HÄNSEL,R.u.KLAFFENBACH,J. Arch.Pharmaz.294,158-72(1961)

37.HÄNSEL,R.,LANGHAMMER, L.u.ALBRECHT,A.G. Tedrahedron Letters 14,599-6o1(1962)

38.HÄNSEL,R.,LANGHAMMER, L.,FRENZEL,H.J.u. RANFT,G. J.Chromatogr.im Druck

39.HARBORNE,J.B. in GEISSMAN,T.A.:"The Chemistry of Flavonoid Compounds"Seite:593-617

4o.HARBORNE,J.B.u. CORNER,J.J. Biochem.J.8o,7-8(1961)

41.HEGI,G. Illustrierte Flora von Mitteleuropa,VI München 19o6

42.HEGNAUER,R. Chemotaxonomie der Pflanzen I Birkhäuser Verlag Basel u.Stuttgart 62

43.HÖRHAMMER,L.,WAGNER,H. u.GLOGGENGIESSER,F, Arch.Pharmaz.291/63,126(1958)

44.HÖRHAMMER,L.u.WAGNER,H. Pharmaz.Ztg.1o4,783(1959)

45.HÖRHAMMER,L.,WAGNER,H., NIESCHLAG,H.u.WILDI,G. Arch.Pharmaz.292/64,38o(1959)

46.HOROWITZ,R.M. J.org.Chem.22,1733(1957)

47.JORGENSON,E.C.u. GEISSMAN,T.A. Arch.Biochem.Biophys.54,72(1955)

48.JORGENSON,E.C.u. GEISSMAN,T.A. Arch.Biochem.Biophys.55,389(1955)

49.JURD,L. in GEISSMAN,T.A.:"The Chemistry of Flavonoid Compounds",Seite:1o7-55

5o.KLEIN,G. S.-B.Akad.Wiss.,Wien,Math.-naturw.K. Abt.I,129,341(192o)

51.KLEIN,G. S.-B.Akad.Wiss.,Wien,Math.-naturw.K. Abt.I,13o,247(1921)

52.KOEPPEN,B.H. Chem.and Ind.1962,2145

53.LAWRENCE,W.J.C.u. SCOTT-MONCRIEFF,R. J.Genet.3o,155(1935)

54.NARASIMHACHARI,N.u. SESHADRI,T.R. Proc.Indian.Acad.Sci.27A,223(1948)

55.NARASIMHACHARI,N.u. SESHADRI,T.R. Proc.Indian.Acad.Sci.3oA,271(1959)

56.NARASIMHACHARI,N.u. SESHADRI,T.R. Chem.Abstr.44,1493(195o)

57.NEU,R. Naturwissenschaften 43,82(1956)

58.NEU,R. Naturwissenschaften 44,181(1957)

59.NEU,R. Naturwissenschaften 45,311(1958)

6o.PAREY's Illustriertes Gartenbau-Lexikon,Berlin-Hamburg 1956

61.PEW,J.C. J.Amer.Chem.Soc.7o,3o31-3o34(1948)

62.REPPEL,L. Die Pharmazie 12,654-62(1957)

63.REZNIK,H. Sitzungberichte d.Heidelberger Akad. d.Wiss.Math.naturw.Kl.1956,2.Abh.

64.REZNIK,H.u.EGGER,K. Z.analyt.Chem.183,196-99(1961)

65.RIMPLER,H. Dissertation in Vorbereitung

66.ROLLER,K. Zeitschrift f.Botanik 44,477-5oo(1956)

67.ROSOLL,A. S.-B.Akad.Wiss.,Wien,Math.-naturw.Kl. Abt.I,89,137(1884)

68.SCHMIDT,H. Biolog.Zentralblatt 81,213-26(1962)

69.SCOTT-MONCRIEFF,R. J.Genet.32,117(1936)

7o.SEIKEL,M.K. J.Amer.Chem.Soc.77,5685(1955)

71.SEIKEL,M.K. in GEISSMAN,T.A.:"The Chemistry of Flavonoid Compounds" Seite:7o-1o6

72.SEIKEL,M.K.u. GEISSMAN,T.A. Arch.Biochem.Biophys.71,17-3o(1957)

73.SESHADRI,T.R. Tedrahedron 6,169-2oo(1959)

74.SESHADRI,T.R. in GEISSMAN,T.A.:"The Chemistry of Flavonoid Compounds" Seite:156-196)

75.SEYFFERT,W. Vorträge für Pflanzenzüchter,Frankfurt/M. 1958

76.SHIMOKORIYAMA,M. in GEISSMAN,T.A.:"The Chemistry of Flavonoid Compounds" Seite:286-316

77.SHINODA,J. J.pharmac.Soc.Japan 48,214(1928)

78.SHINODA,J.u.UYEDA,S. Berichte 67,434(1934)

79.STAHL,E.u.SCHORN,P.J. Hoppe Seylers Z.physiol.Chem.325,263(1961)

8o.STRASBURGER,E. Lehrbuch der Botanik für Hochschulen Fischer Jena 1958

81.SWAIN,T. Biochem.J.53,2oo(1953)

82.SWAIN,T.u.BATE-SMITH, E.C. in FLORKIN,M.u.MASON,H.S.:"Comparative Biochemistry"Vol.III Part A,S:755-8o9, Academic Press New-York und London

83.WILLDENOW,C. Enumeratio Plant.Hort.Berol.II

Lebenslauf

Am 16.5.1935 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Walter Frenzel und seiner Ehefrau Alice,geb.Weber, in Dresden geboren.

Nach Absolvieren der allgemeinen achtklassigen Grundschule besuchte ich vier weitere Jahre die Oberschule Dresden-Ost in Dresden,wo ich 1954 das Abitur ablegte.

Von 1954 bis 1955 nahm ich an einem Sonderlehrgang für Ostabiturienten am Goethegymnasium in Berlin-Wilmersdorf teil und erhielt hier auf Grund einer Zusatzprüfung die Anerkennung des bereits in Dresden erworbenen Reifezeugnisses.

Vom Wintersemester 1955/56 bis zum Sommersemester 1958 studierte ich an der Freien Universität Berlin. Ein Auslandsstipendium ermöglichte mir einen zweisemestrigen Aufenthalt an der Universität in Graz. Zum Wintersemester 1959/6o kehrte ich an die Freie Universität Berlin zurück und bestand am 22.Februar 1961 vor dem Wissenschaftlichen Landesprüfungsamt Berlin die "Erste (Wissenschaftliche) Staatsprüfung für das Amt des Studienrats" in den Fächern Biologie und Chemie.

Seitdem beschäftige ich mich mit der vorliegenden Arbeit unter der Leitung von Herrn Prof.Dr.R.Hänsel, Direktor des Instituts für Pharmakognosie der Freien Universität Berlin.

Druck: Arno Brynda, Berlin 30